

BAKTERİLERDE VE BAKTERİYOFAJLARDA GENETİK ANALİZLER VE HARİTALAMA



Giriş

- Bu bölümde bakteriler ve bakteriyofajlardaki genetik olaylara göz atacağız.
- Bakterilere ve plazmitlere ilişkin bilgilerimiz, DNA klonlama ve rekombinant DNA çalışmalarına dayanmaktadır.

Giriş

- Bakteriler ve virüsler birkaç nedenden dolayı genetik çalışmalarında kullanılırlar:
 - Üreme döngüleri kısadır,
 - Saf kültürler halinde çalışılabilirler.
- Bu bölümde özellikle üzerinde duracağımız konu, bir bakteri hücresinin diğer hücreden genetik bilgiyi nasıl elde ettiğidir.

Bakterilerde mutasyon

- Bakteriler çevresel faktörlere karşı değişik tepkiler ortaya koyarak hayatta kalma becerileri gösterirler.
- Örn; *E. coli* bakterileri T1 bakteriyofajı ile enfeksiyona duyarlıdırlar.
- Enfeksiyon sonucunda bakteri hücrelerinin büyük bir kısmı eriyerek parçalanır (lisis).

Bakterilerde mutasyon

- Fakat nadiren de olsa hayatta kalan bireyler vardır.
- Bu bireylerin saf kültürleri elde edilirse T1 fajına dirençli populasyonlar ortaya çıkar.
- Buna uyum (adaptasyon) hipotezi adı verilir.

Kendiliğinden olan mutasyonlar

- Bazı durumlarda dirençlilik T1 faji gibi herhangi bir etkenle karşı karşıya kalınmaksızın da gerçekleşebilir.
- Bakterilerde mutasyonların kendiliğinden gerçekleşebileceği, 1943 yılında Salvador Luria ve Max Delbruck tarafından ortaya konulmuştur.
- Dalgalanma (fluctuation) testi olarak bilinen bu çalışmanın ayrıntılarına ilerleyen bölümlerde yer verilecektir.

Mutantların seğimi

- Bazı özelliklerden dolayı mutant bakteriler kültür kaplarında diğerlerinden izole edilebilirler.
- Bu organizmaların alt kültürlerinin yapılması ile tamamen mutantlardan oluşan kültürler oluşturulabilir.
- Bu şekilde istenilen özellikte her türlü mutasyon meydana getirilebilir.

Mutantların seğimi

- Bakteri ve virüsler haploit kromozom takımına sahip olduklarından mutasyonları fenotipte görmek daha kolaydır.
- Bu da onların seğilmesini kolaylaştırır.

Minimal besiyeri

- Bu besiyerinin besin içeriği çok basittir.
- Sadece;
 - Organik karbon kaynağı (glukoz veya laktoz)
 - Çeşitli inorganik iyonlar (Na^+ , Mg^{++} , Ca^{++} vb)
 - Inorganik tuzlar (NH_4^+ vb)

Minimal besiyeri

- Bu besiyerinde üreyen bakteriler çoğalabilmek için organik maddelerin hepsini kendileri sentezleyebilmelidir:
 - Aminoasitler
 - Pürinler
 - Pirimidinler
 - Vitaminler
 - Şekerler
 - Yağ asitleri

Kendi beslek (prototrof) bakteriler

- Bu organik besin maddelerini sentezleyebilen bakterilere kendi beslek (prototrof) bakteriler adı verilir.
- Bütün üreme ihtiyaçlarını kendileri karşılayabildikleri için yabanıl tip olarak bilinirler.

Dış beslek (okzotrof) bakteriler

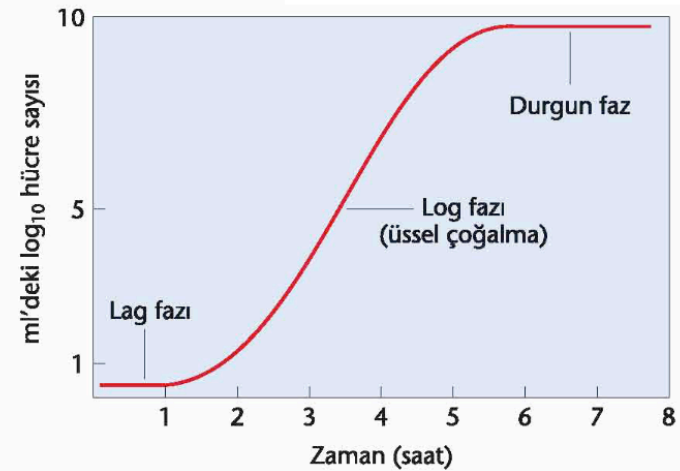
- Eğer bakteri herhangi bir mutasyon sonucunda bir ya da daha fazla organik maddeyi sentezleyemez ise bu tip bakterilere dış beslek (okzotrof) adı verilir.
- Örn; bir bakteri histidin aminoasidini sentezleme yeteneğini kaybederse his⁻ şeklinde gösterilir.

Dış beslek (okzotrof) bakteriler

- Bu bakterilerin çoğalabilmesi için mutlaka besiyerine histidin ilave edilmesi gerekmektedir.
- Gereksinimlerin besi ortamına dışardan ilavesi sonucunda elde edilen besiyerlerine tamamlanmış (complete) besiyeri adı verilir.

Bakterilerde büyüme eğrisi

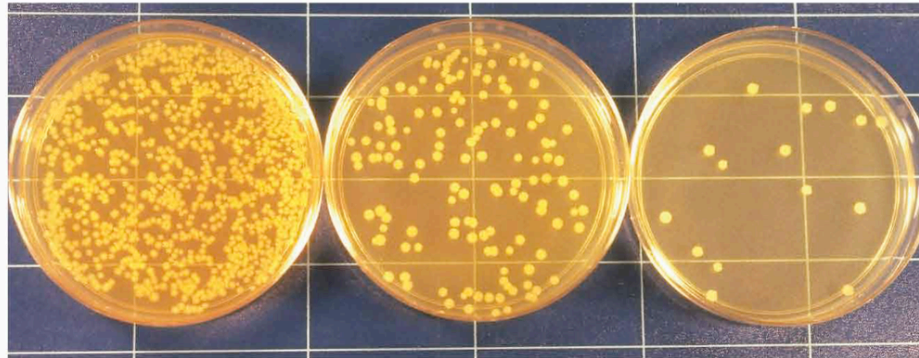
- Mutant bakterileri besiyerinde çoğaltmak istediğimizde tipik bir büyüme eğrisi gösterirler.
- Lag fazında üreme yavaştır.
- Log fazında hücreler hızlı bir üreme gösterirler.
- Bakteriler ml'de 10^9 hücre yoğunluğuna ulaştıklarında besinler, çoğalma için sınırlayıcı duruma gelir ve duraklama (stationary) fazına geçerler.



ŞEKİL 6-1 Başlangıçtaki Lag fazını, bunu izleyen üssel şekilde çoğalmanın olduğu logaritmik fazı ve besinler tükenince oluşan duraklama fazını gösteren bakteri popülasyonunun tipik üreme eğrisi.

Hücrelerin sayımı

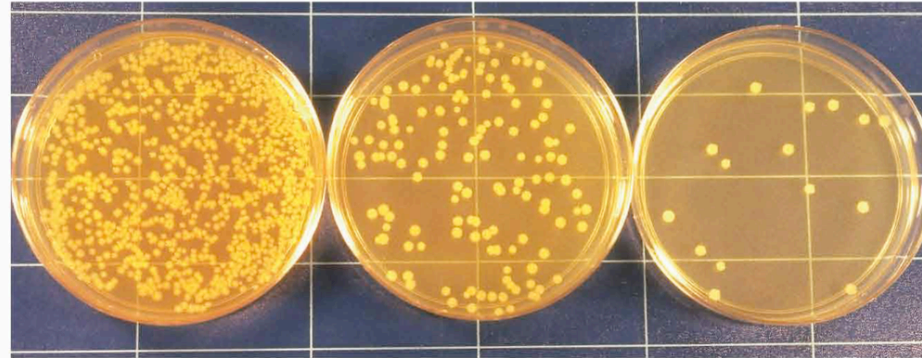
- Sıvı besiyerinde çoğaltılan hücreler yarı katı besiyerine aktarılarak sayılabilir.
- Yarı katı besiyerinde hücreler koloniler oluşturur.



ŞEKİL 6-2 Seri sulandırım tekniğinin sonuçları ve bunu takiben oluşan bakteri kültürü. Her sulandırım 10 kat kadar birbirinden farklıdır. Her koloni tek bir bakteri hücrelerinden oluşur.

Hücrelerin sayımı

- Koloniler sayılarak kültürdeki hücre sayısı tahmin edilebilir.
- Koloniler sayılmayacak kadar çok ise ana kültürün peş peşe seyreltmesi yapılır (seri sulandırım).



ŞEKİL 6-2 Seri sulandırım tekniğinin sonuçları ve bunu takiben oluşan bakteri kültürü. Her sulandırım 10 kat kadar birbirinden farklıdır. Her koloni tek bir bakteri hücrelerinden türer.

Konjugasyon

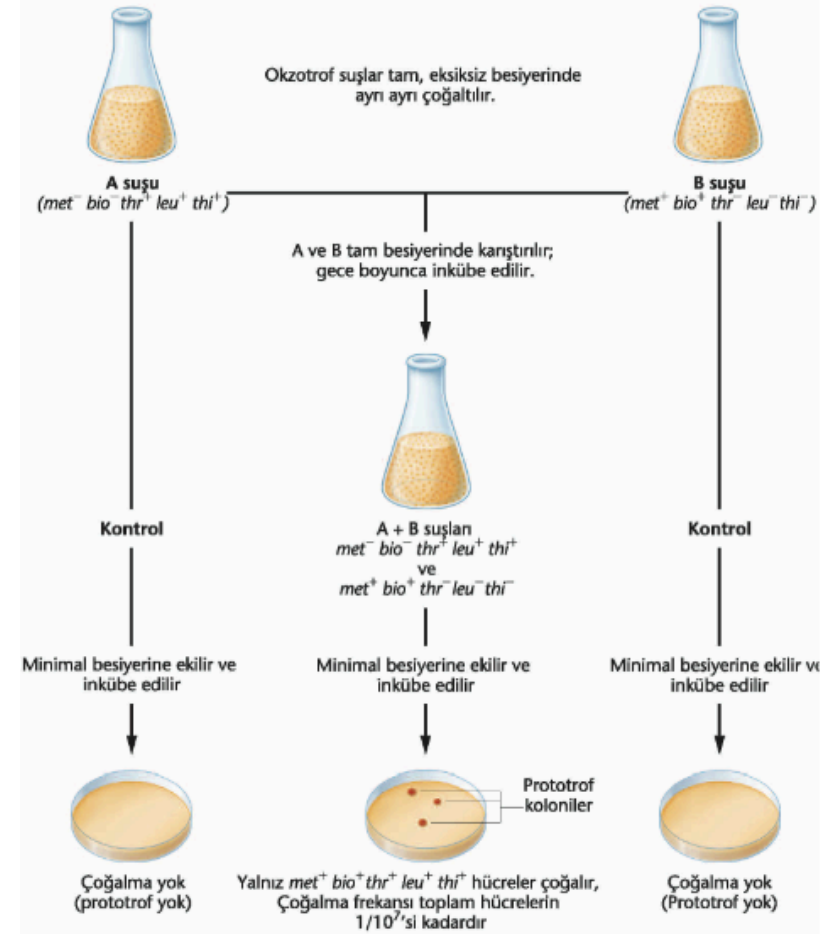
- Konjugasyon, genetik bilginin bir bakteriden diğesine aktarımı ve diğ bakterininki ile rekombinasyonudur.
- Ökaryotlarda mayoz sırasında gerçekleşen krossing-over ile benzer bir mantığa sahiptir.

Konjugasyon

- Bakterilerde kromozom haritalama yöntemlerinin geliştirilmesinin temelini oluşturur.
- Bu olayda bir suşta mevcut olan bir veya daha fazla gen, başka bir suştaki genler ile yer değiştirir.
- Bu durum, genotipin değişmesi ile sonuçlanır.

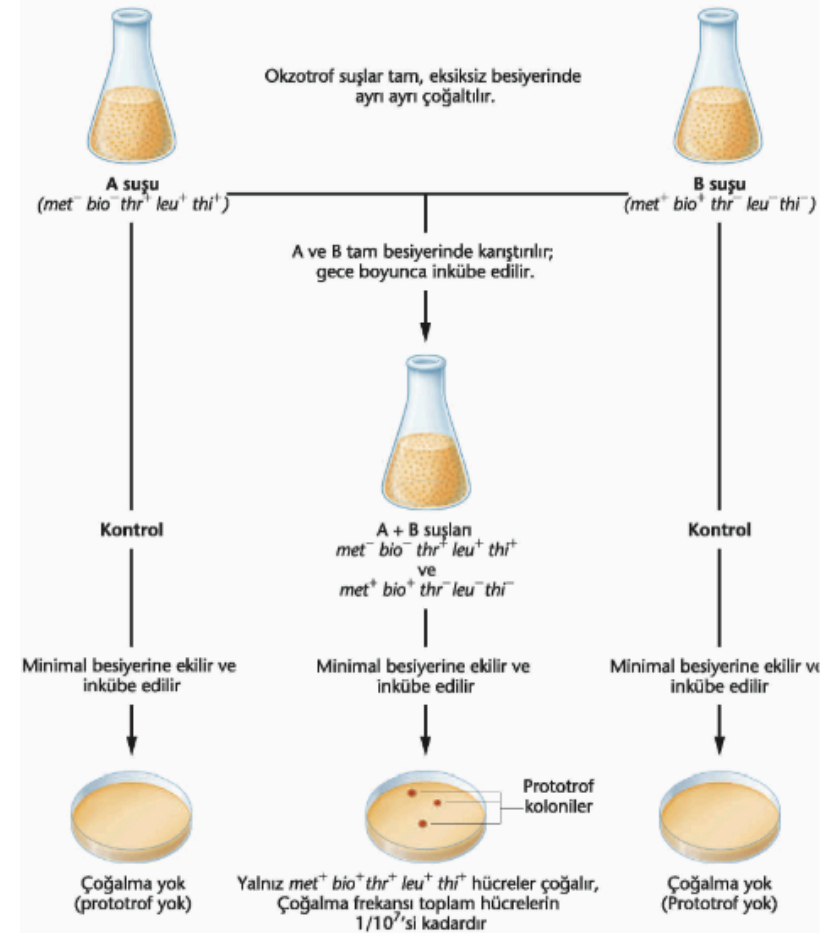
Konjugasyon-Deney !!!

- Lederberg ve Tatum, çoklu okzotrof olan iki *E. coli* K12 mutant suşu ile kojugasyon üzerine deney yapmışlardır.
- A suşunun üreyebilmek için methionin (met) ve biotin'e (bio) ihtiyacı vardır.
- B suşunun ise üreyebilmesi için threonin (thr), lösin (leu) ve thiamin'e (thi) gereksinimi bulunmaktadır.



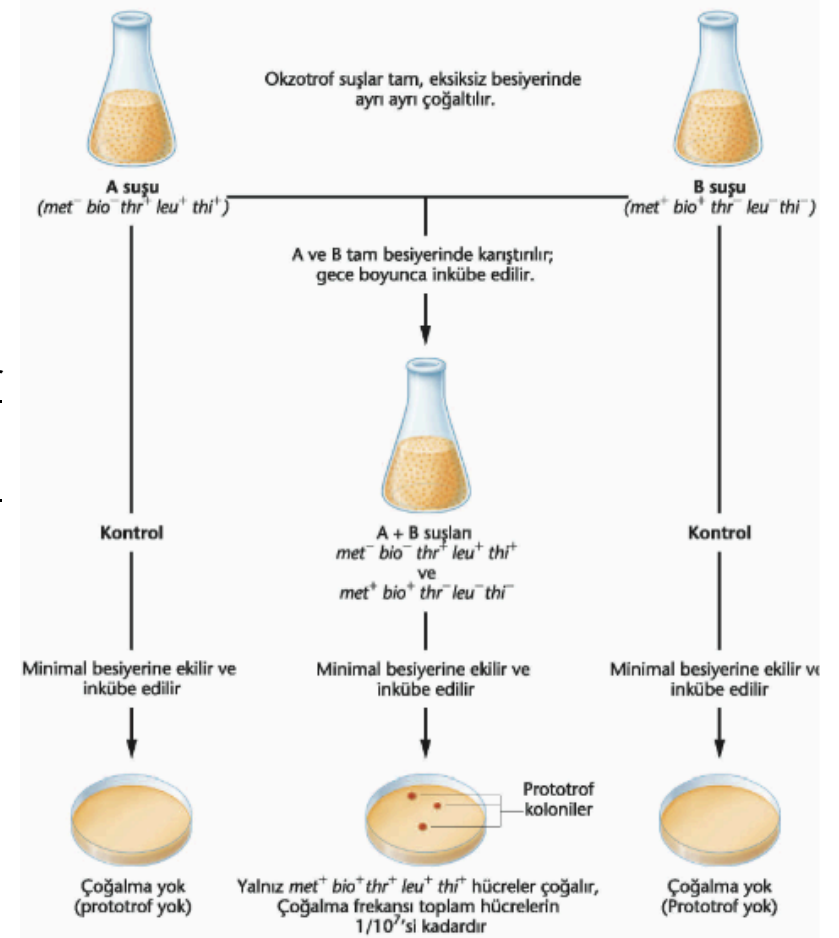
Konjugasyon-Deney !!!

- Bu suşlardan hiçbiri minimal besiyerinde üreyemez.
- Önce bu suşlar ilgili maddeleri içeren besiyerlerinde çoğaltılmışlardır.
- Daha sonra aynı besiyerinde karıştırılarak birkaç kuşak boyunca çoğaltılmışlardır.
- Daha sonra tekrar minimal besiyerine ekilmişlerdir.



Konjugasyon-Deney !!!

- Minimal besiyerinde üreyen suşlar artık prototroftur.
- İki ya da üç gen bölgesinde mutasyon taşıdığı için bazı besin maddelerini sentezleyemeyen bir bakterinin, bu genlerin hepsinde birden madde sentezleyebilecek şekilde mutasyon geçirmesi düşük bir olasılıktır.
- Dolayısıyla burada, okzotrofları prototroflara dönüştüren bir çeşit genetik değiş-tokuş sözkonusudur.

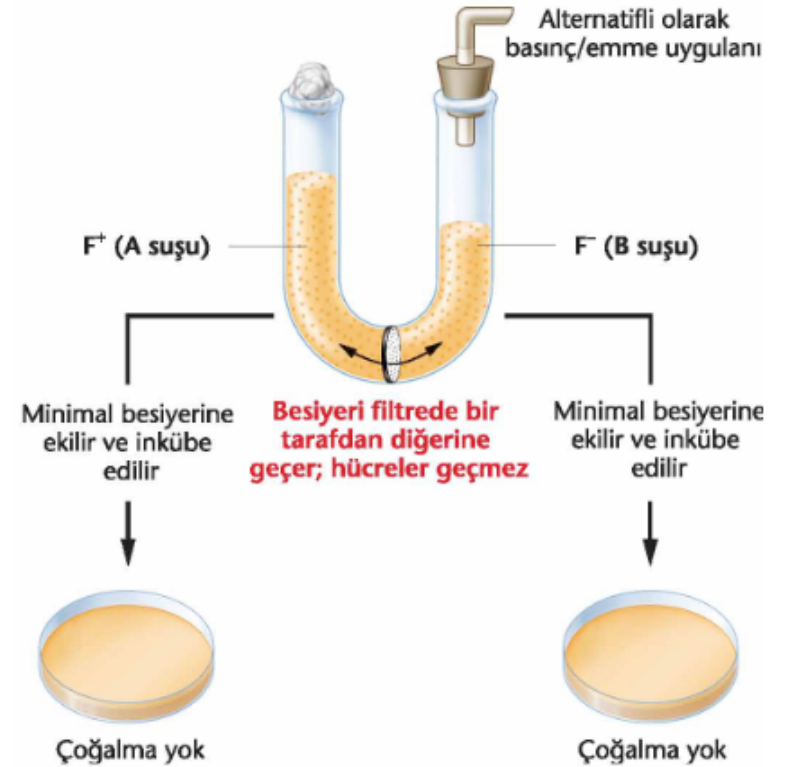


F⁺ ve F⁻ bakteriler

- Konjugasyonda kromozomun bir bölümünü karşıdaki hücreye veren hücrelere F⁺ denir.
- Alıcı hücreler ise F⁻ olarak bilinir ve genetik materyali kendi kromozomu ile birleştirir.

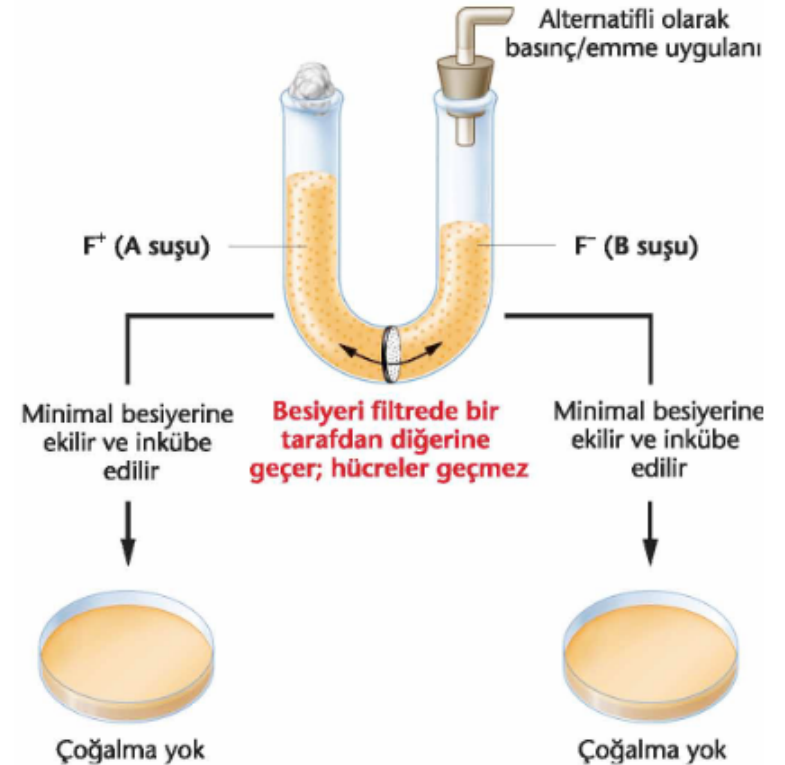
Deney-U tüpü yöntemi

- Konjugasyonda genetik materyal aktarımı için doğrudan hücre teması gereklidir.
- Bunu kanıtlamak için Bernard Davis, F^+ ve F^- hücrelerin çoğaltıldığı U tüpü yöntemini geliştirmiştir.
- Tüpün tabanında sıvı besiyerinin girebileceği fakat bakterinin geçemeyeceği gözeneklere sahip bir cam filtre vardır.



Deney-U tüpü yöntemi

- Filtrenin bir tarafına F^+ , diğer tarafa F^- okzotrof hücreler yerleştirilir.
- Besiyeri, filtrenin her iki tarafına serbestçe geçebilir.
- Davis, tüpün her iki tarafından aldığı örneklerde hiçbir prototrofa rastlamamıştır.
- Bu sonuca dayanarak konjugasyon için fiziksel temasın gerekli olduğunu ileri sürmüştür.



F pilus

- Fiziksel temas, konjugasyonun başlangıç evresidir.
- Konjugasyon, F pilus (veya cinsiyet pilusu) denen tüpler aracılığıyla gerçekleşir.
- Bakteriler, hücreden tüp şeklinde uzanan mikroskobik yapılar olan çok sayıda pilusa sahiptir.
- Çiftleşecek olan suşlar arasında F piluslar aracılığıyla temas kurulduktan sonra kromozom aktarımı başlar.



ŞEKİL 6-5 F^- ve F^+ *E. coli* hücreleri arasındaki konjugasyonun elektron mikroskopundaki görüntüsü. Hücrelerin arasında bağlantıyı sağlayan seks pilusu açıkça görülmektedir.

F faktörü

- F⁺ hücreler, F faktörü olarak bilinen bir dölleme faktörüne sahiptirler.
- Dolayısıyla bu hücreler, konjugasyonda kromozomun bir parçasını verme yeteneğine sahiptir.

F faktörü

- Bazı araştırmacılar, bazı çevresel faktörlerin, F faktörünü ortadan kaldırdığını göstermişlerdir.
- Bu “kısır” hücreler, kısır olmayan hücreler ile (F⁺) bir arada tutulursa, F⁺ özelliğini tekrar kazanabilmektedir.

F faktörü hareketlidir

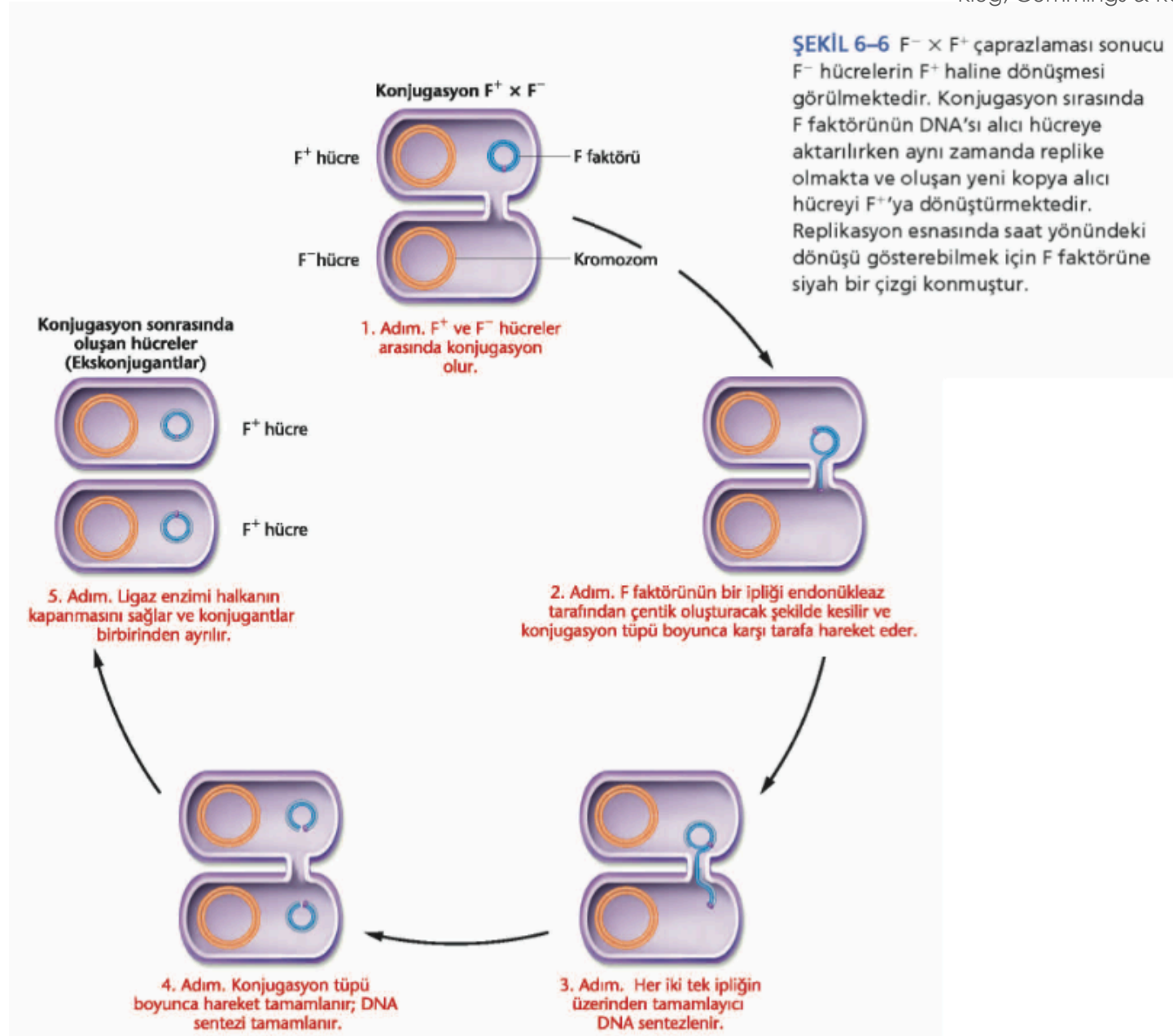
- Konjugasyonu takiben F⁻ hücre, daima F⁺ konumuna geçmektedir.
- Bu da, F faktörünün hareketli bir element olduğunu göstermektedir.
- F faktörü bakteri kromozomundan ayrı, çift iplikli, halkasal bir DNA'dır ve yaklaşık 100.000 nükleotit çifti uzunluğundadır.

F faktörü hareketlidir

- F faktöründe genetik bilginin transferinde görev alan 20'den fazla gen vardır.
- Bu genler tra genleri olarak isimlendirilir ve seks piluslarının oluşması için gereklidir.

F faktörü aslında;

- Yakında göreceğimiz gibi, F faktörü aslında kendi başına bir genetik birimdir ve plazmit olarak adlandırılır.
- Konjugasyon sırasında F faktörünün davranışı bir sonraki slaytta bulunan şekilde adım adım verilmiştir.



Hfr bakteriler

- 1950 yılında *E. coli*'nin F⁺ suşu, mutant bir gaz olan hardal gazı ile muamele edilmiştir.
- Bu madde ile muamele sonucunda orijinal F⁺ hücrelerden 1000 kez daha fazla rekombinasyona uğrama kapasitesine sahip yeni bir hücre tipi elde edilmiştir.

Hfr bakteriler

- Bu suşa, Hfr veya yüksek sıklıkta rekombinasyon yapabilen (high frequency of recombination) adı verilmiştir.
- Hfr hücrelerde, sitoplazmada serbest halde bulunan F faktörü, bakteri kromozomuna entegre olmaktadır.

F⁺ hücreler ile Hfr hücreler arasındaki önemli fark

- Hfr hücre, bir F⁻ hücre ile birleştiğinde, F⁻ hücre asla Hfr olmaz.
- F⁺ hücre, bir F⁻ hücre ile birleştiğinde ise F⁻ hücre genellikle F⁺ olur:
 - $F^+ \times F^- = \text{Alıcı } F^+ \text{ olur}$
 - $Hfr \times F^- = \text{Alıcı } F^- \text{ olarak kalır}$

Durdurulmuş aprazlama yöntemi

- Hfr ve uygun marker genlere sahip antibiyotik dirençli F⁻ hücreler karıştırılmıştır.
- Bu durumda farklı zamanlarda özel genlerin rekombinasyonu gözlenmiştir.
- Bu durumu açıklığa kavuşturmak için Hfr ve F⁻ hücreler bir karışım halinde inkübe edilmiştir.

Durdurulmuş aprazlama yöntemi

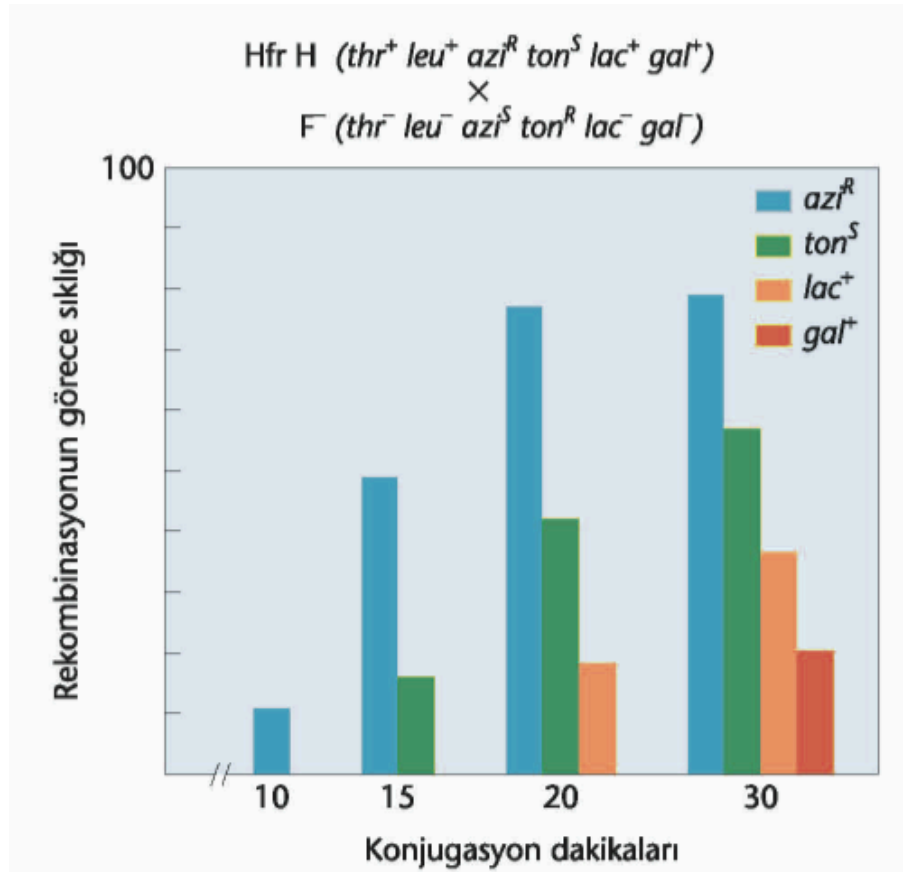
- Belirli zaman aralıklarında kültürden örnekler alınarak blender'den geçirilmiştir.
- Böylece konjugasyon halindeki bakterilerin birbirinden ayrılmaları sağlanmıştır.
- Daha sonra hücreler antibiyotik içeren besiyerlerinde çoğaltılmıştır.

Durdurulmuş aprazlama yöntemi

- Böylece sadece alıcı hücrelerin elde edilmesi sağlanmıştır.
- Yapılan incelemelerde, belirli bir Hfr suşunun bazı genlerinin, diğer genlerden daha önce transfer edildiği anlaşılmıştır.

Durdurulmuş çaprazlama yöntemi

- İki suş karşılaştırıldığında;
 - İlk 8 dk'da hiçbir genetik aktarım görülmez.
 - 10 dk sonra azi^R geninin aktarımı görülür.
 - 15 dk sonra ton^S geninin aktarımı görülür.
 - 20 dk sonra lac^+ geninin aktarımı görülür.
 - 30 dk sonra ise gal^+ geni de aktarılmaya başlanır.



Durdurulmuş çaprazlama yöntemi

- Hfr bakterisi, kromozomu doğrusal olarak transfer ediyor gibi görünmektedir.
- Gen sırası ve genler arasındaki uzaklık olarak ölçülebilmektedir.
- Bu bilgi, E. coli kromozomunun genetik haritasının oluşturulmasında temel teşkil eder.
- Bakteriyel haritalamadaki dakikalar, ökaryotlardaki harita birimine karşılıktır.



Gen aktarım sırası Hfr suşunun çeşidine göre değişir

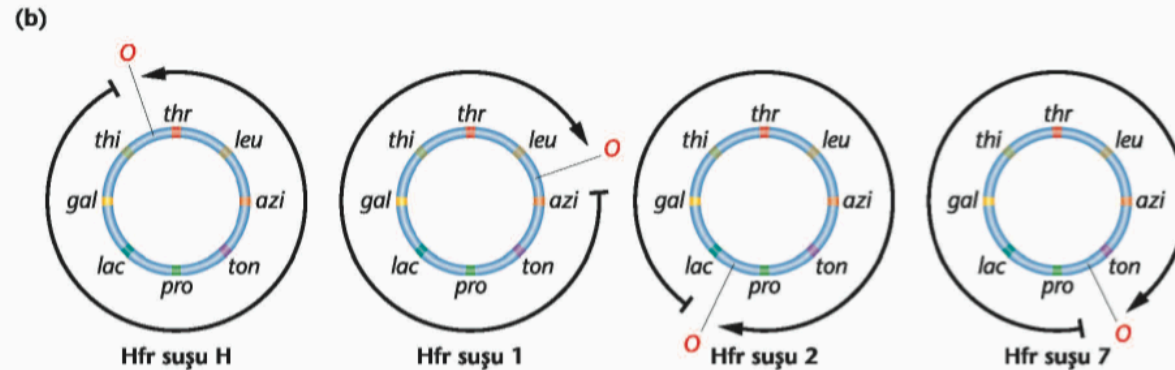
- Hangi genin ilk, hangi genin ondan sonra aktarılacağı bir Hfr suşundan diğerine değişmektedir.
- Genetik aktarılma oranı incelendiğinde her suş için farklı genetik harita modelleri ortaya çıkar.

Gen aktarım sırası Hfr suşunun çeşidine göre değişir

- Her suş arasındaki ana farklılık, oriğin noktası ve o noktadan girişin yapıldığı yöndür.

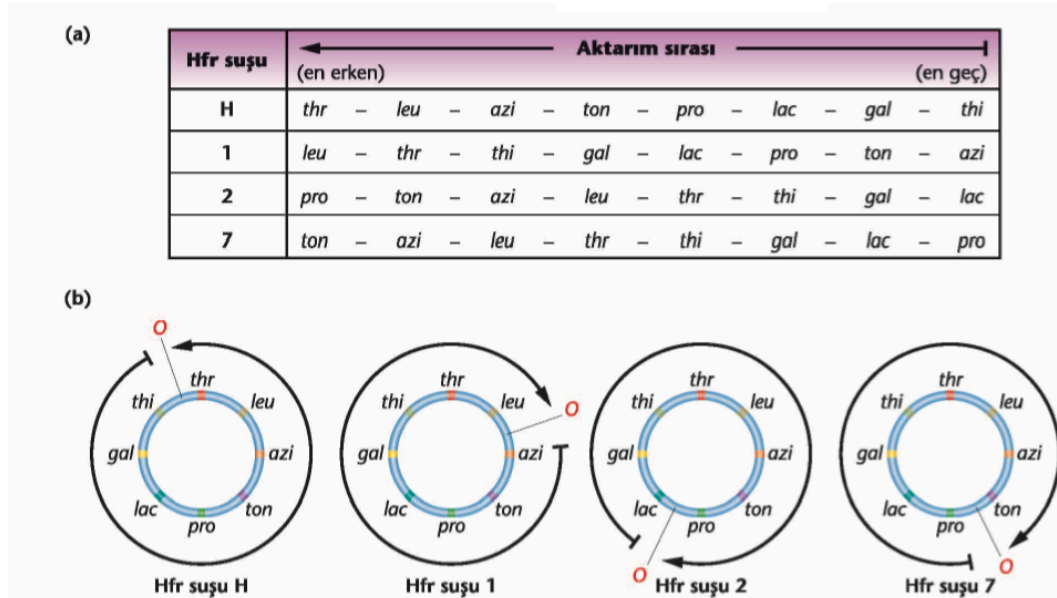
(a)

Hfr suşu	Aktarım sırası	
	(en erken)	(en geç)
H	<i>thr</i> - <i>leu</i> - <i>azi</i> - <i>ton</i> - <i>pro</i> - <i>lac</i> - <i>gal</i> - <i>thi</i>	
1	<i>leu</i> - <i>thr</i> - <i>thi</i> - <i>gal</i> - <i>lac</i> - <i>pro</i> - <i>ton</i> - <i>azi</i>	
2	<i>pro</i> - <i>ton</i> - <i>azi</i> - <i>leu</i> - <i>thr</i> - <i>thi</i> - <i>gal</i> - <i>lac</i>	
7	<i>ton</i> - <i>azi</i> - <i>leu</i> - <i>thr</i> - <i>thi</i> - <i>gal</i> - <i>lac</i> - <i>pro</i>	



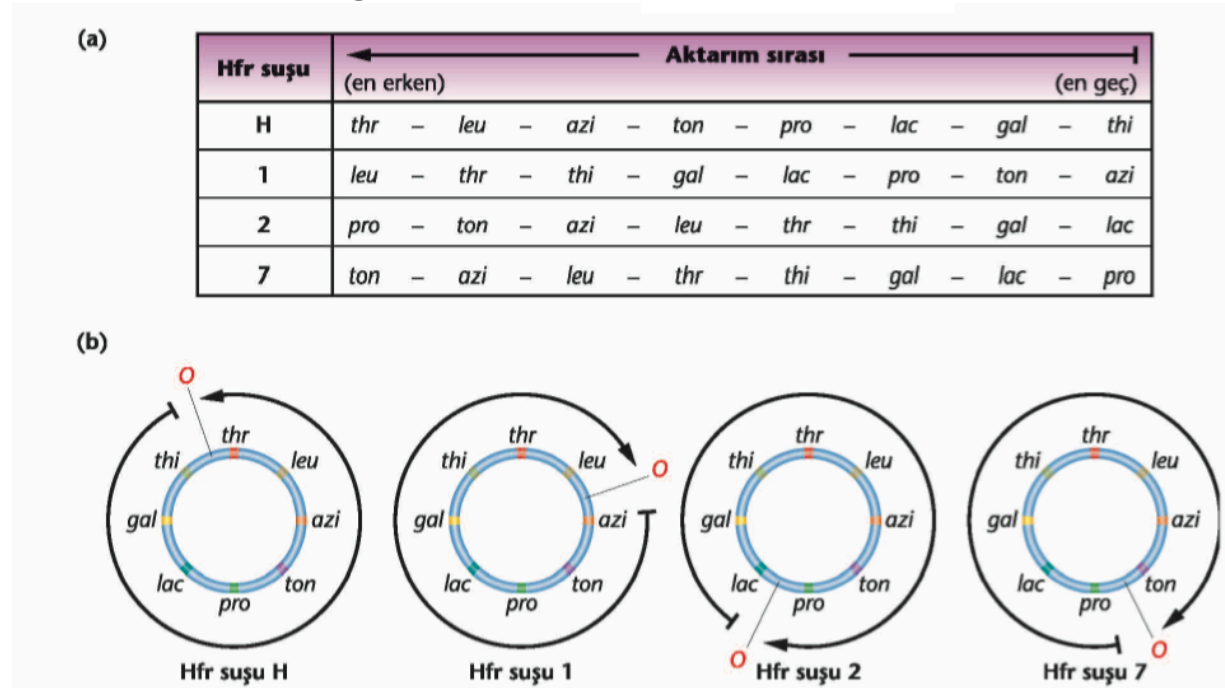
O halde *E. coli* kromozomu halkasaldır

- Biraz önce anlatılan gen aktarım şekli ve sırası, kromozomun halkasal olması gerektiğini düşündürmektedir.



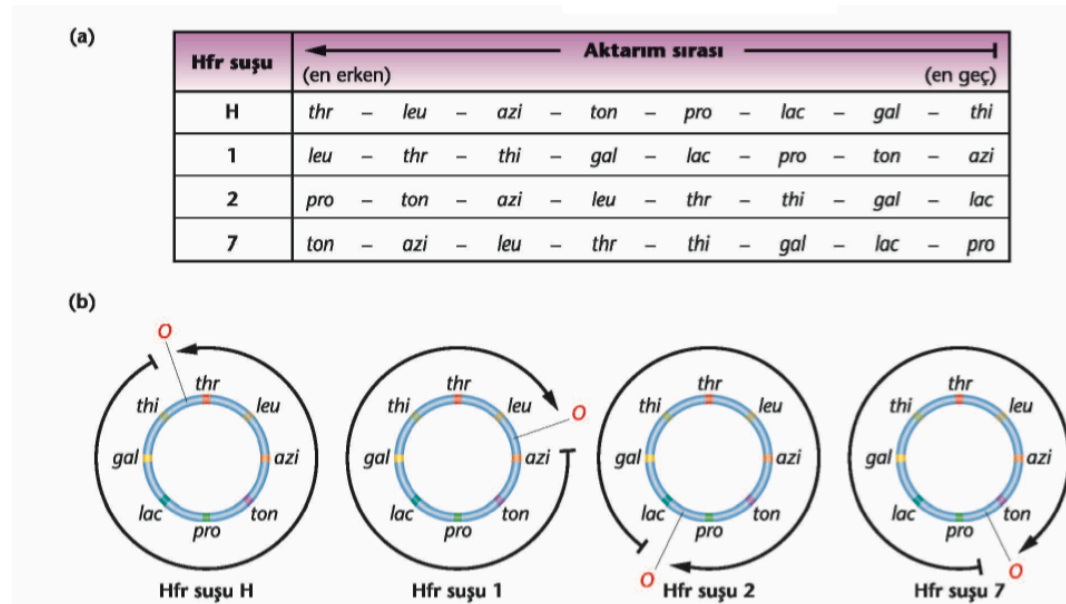
O halde *E. coli* kromozomu halkasaldır

- Eğer oriğin noktası (O) bir suştan diğerine değişiyor ise, her bir farklı durumda genler farklı bir sırada aktarılacaktır.



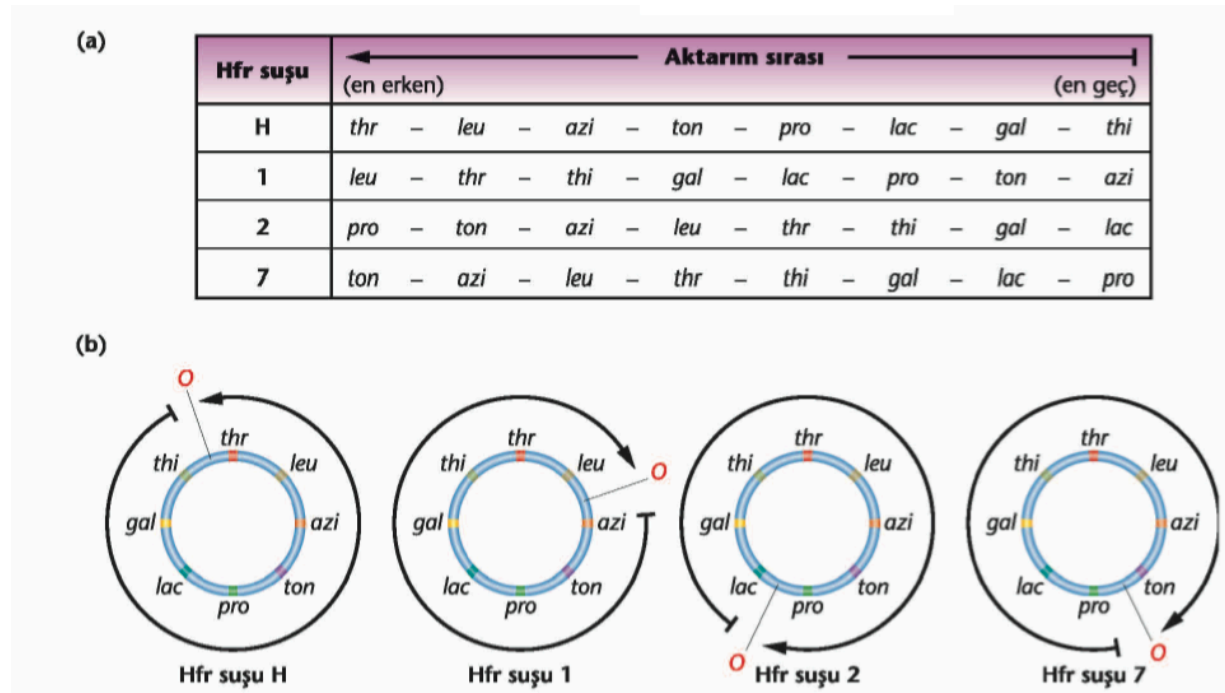
Orijin noktasını (O) belirleyen nedir?

- Bazı araştırmacılar, çeşitli Hfr suşlarında F faktörünün kromozoma farklı noktalardan girdiği ve F faktörünün pozisyonununun O'nun yerini belirlediğini önermişlerdir.



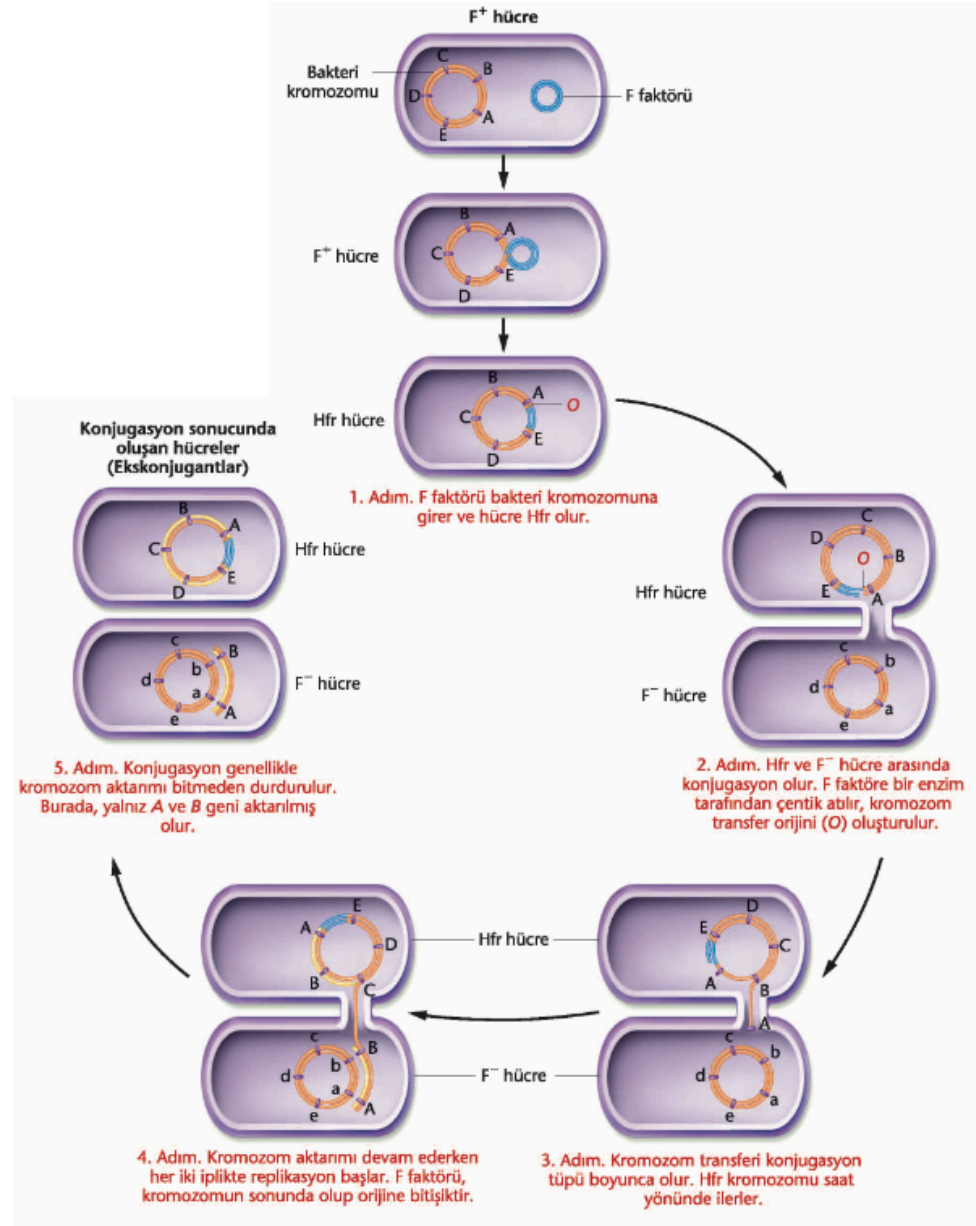
O halde *E. coli* kromozomu halkasaldır

- O noktasına bitişik genler ilk transfer olanlardır.



Orijin noktasını (O) belirleyen nedir?

- F faktörü, transfer edilecek son bölümü oluşturur.
- Konjugasyon yeteri kadar uzun sürerse kromozomun tamamı tüpün içinden geçebilir.



F' durumu ve Merozigotlar

- 1959 yılında yapılan deneylerde, kromozoma katılmış olan F faktörünün serbest kalabileceği ve hücrenin tekrar F⁺ durumuna dönebileceği anlaşılmıştır.

F' durumu ve Merozigotlar

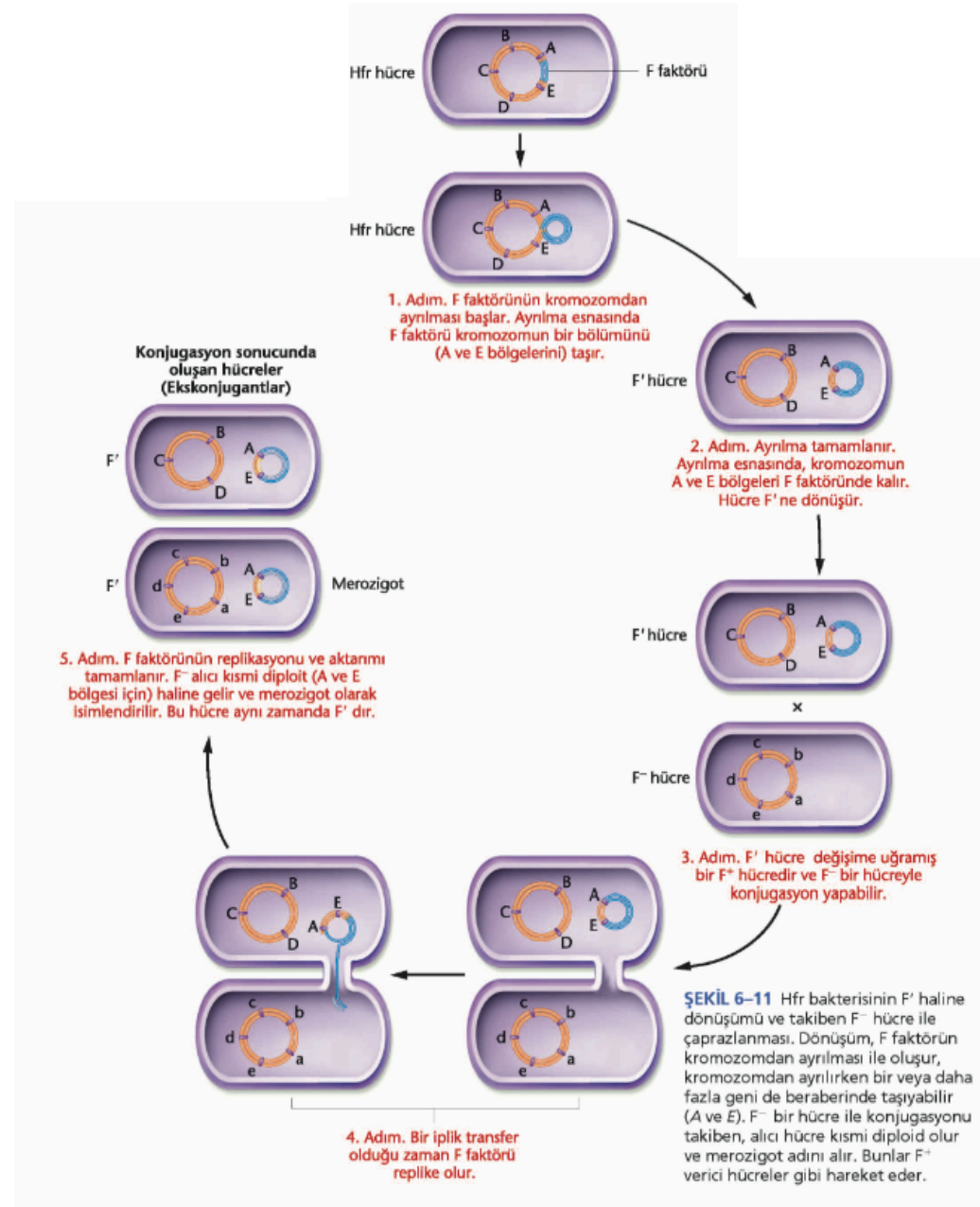
- Bu durumda F faktörü çoğunlukla kendisi ile beraber, kendisine bitişik birkaç geni de beraberinde götürür.
- Bu durumu Hfr ve F⁺'dan ayırmak için F' simgesi kullanılır.
- F' bakterisi, F⁺ hücresi gibi hareket eder ve F⁻ hücrelerle konjugasyon başlar.

F' durumu ve Merozigotlar

- Bu durumda kromozomal genleri içeren F faktör, F-hücreye geçer.
- Sonuç olarak kromozomun hangi geni F faktörüne geçmişse, o gen alıcı hücrede iki adet bulunacaktır.
- Bu durum, merozigot olarak adlandırılan kısmi diploit bir hücre yaratır.

F' durumu ve Merozigotlar

- F' merozigot hücreler saf kültürler halinde elde edilebilirler.
- Bu hücreler bakterilerdeki genetik regülasyon çalışmalarında son derece faydalıdır.



Rec proteinleri

- Alıcı hücrede genetik rekombinasyon gerçekte nasıl meydana gelmektedir?
- Verici DNA, alıcı kromozomdaki benzer bölgeye nasıl yerleşmektedir?
- Bu konudaki en önemli ilerleme, rec genlerini temsil eden bir grup mutasyonun keşfedilmesi sonucunda elde edilmiştir.

Rec proteinleri

- Bu genler; recA, recB, recC ve recD adıyla bilinen genlerdir ve sırasıyla RecA, RecB, RecC ve RecD proteinlerini kodlarlar.
- RecA proteini, hem tek iplikli DNA molekülünün hem de doğrusal ucu olan açılmamış çift iplikli DNA molekülünün rekombinasyonunda önemli rol oynar.

Rec proteinleri

- Tek iplik yer değiştirmesi birçok bakteri hücrelerinde rekombinasyon sırasında yaygın olarak görülür.
- Çift iplikli DNA hücreye girdiği zaman ipliklerden biri çoğunlukla parçalanır.
- Tamamlayıcı iplik ise rekombinasyon için kaynak olarak kalır.

Rec proteinleri

- Bu iplik, konak kromozomunda homoloğu olan bölgeleri bularak oralara yerleşir.
- RecA proteini, bu rekombinasyonu kolaylaştırır.
- RecBCD proteini ise DNA sarmalını açmakla görevlidir.

F faktörler aslında plazmitlerdir !!!

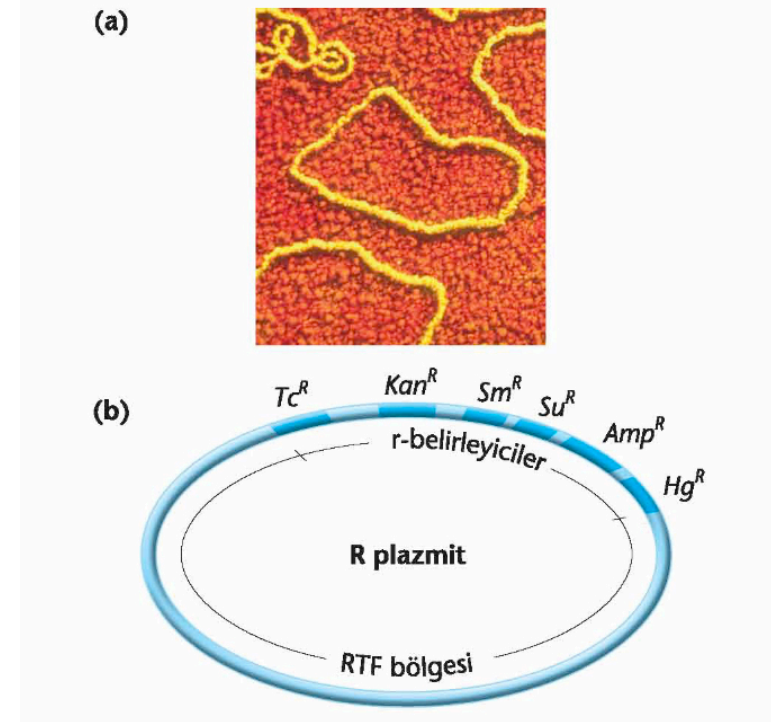
- F faktörü bakteri sitoplazmasında tek başına bulunduğunda çift iplikli halkasal DNA şeklindedir.
- Bu yapının günümüzde bilinen adı plazmit'tir.
- Plazmit replikasyonu, konak hücrenin replikasyonunu gerçekleştiren enzimler tarafından gerçekleştirilir.
- Plazmitler, hücre bölünmesi sırasında konak kromozomu ile birlikte yavru hücrelere dağılır.

Plazmit çeşitleri

- Plazmitler, taşıdıkları genetik bilgiye göre sınıflandırılabilirler.
- F plazmitleri cinsiyet piluslarının oluşumu için gerekli genleri taşır.
- Diğer plazmitler ise R ve Col plazmitleridir.

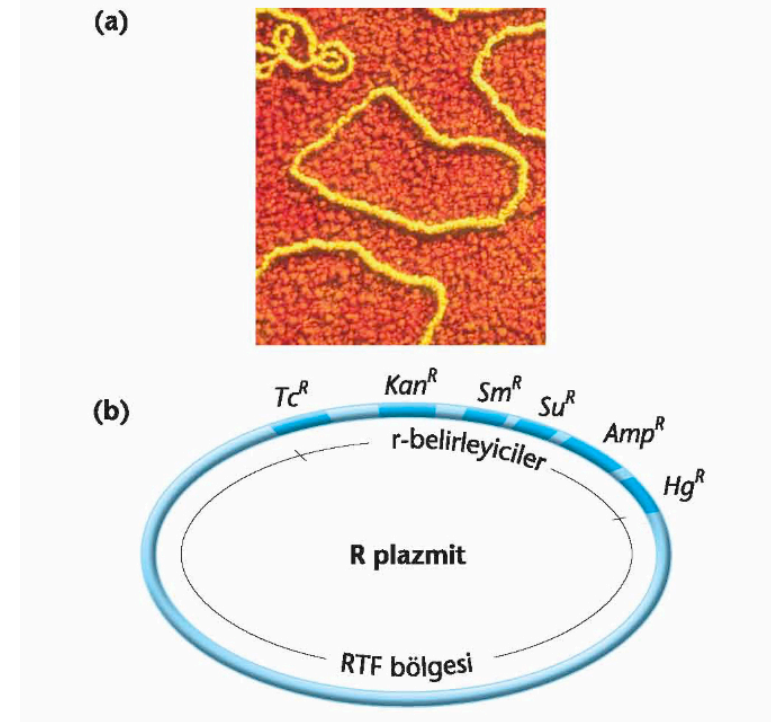
R plazmitleri

- R plazmitlerinin çoğu iki bileşenden oluşur:
 - Direnç transfer faktörü (resistance transfer factor-RTF)
 - Bir veya daha fazla r-belirleyicileri
- RTF, bakteriler arasında konjugasyon yoluyla plazmit geçişini sağlayan genetik bilgiyi kodlar.



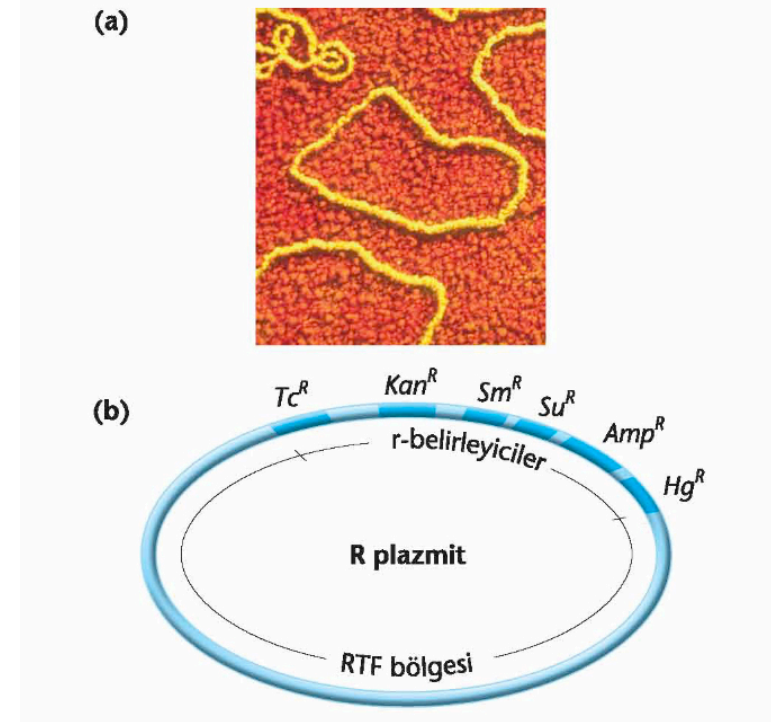
R plazmitleri

- r-belirleyiciler ise antibiyotiklere dirençlilik sağlayan genlerdir.
- RTF'ler farklı bakteri türlerinde oldukça benzerdir.
- Ancak r-belirleyiciler oldukça geniş çeşitlilik gösterirler.



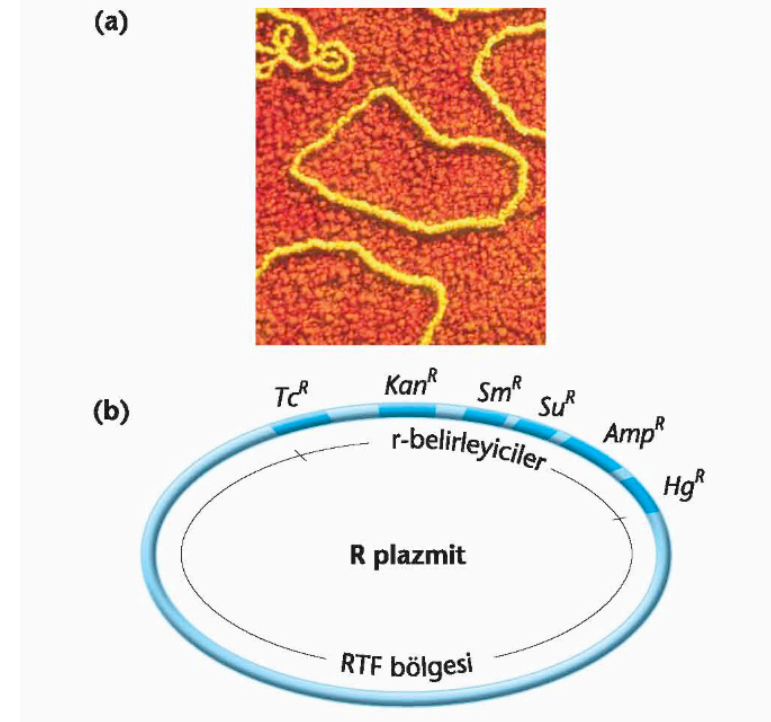
R plazmitleri

- Her biri bir sınıf antibiyotiğe direnç için özelleşmiştir.
- Bu plazmitleri taşıyan bakteriler ilgili antibiyotiklere direnç özelliği gösterir.
- Ancak direnci belirleyen genetik bilgi alıcı hücreye transfer edilmez.



R plazmitleri

- En sık rastlanan r-belirleyiciler aşağıdaki antibiyotiklere karşı dirençlilik sağlar:
 - Tetrasiklin
 - Streptomisin
 - Ampisilin
 - Sulfonamit
 - Kanamisin
 - Kloramfenikol
- Bunların hepsi tek bir plazmit üzerinde yer alır ve çoklu direnç sağlar.



Col plazmitleri

- *E. coli*'den türemiş olan ColE1 plazmiti (Col plazmit) R plazmitlerinden çok farklıdır.
- Aynı plazmidi taşımayan bakteri suşlarına karşı oldukça toksik olan proteinleri şifrelerler.
- Bu proteinler kolisin olarak adlandırılır ve komşu hücreleri öldürebilir.

Col plazmitleri

- Bu plazmidi taşıyan bakterilere kolisinojenik adı verilir.
- Hücrede 10-20 kopya halinde bulunan plazmitlerdir.
- Konak organizmayı bu toksinlerin etkisinden koruyacak bağışıklık proteinlerini kodlarlar.

Col plazmitleri

- Col plazmitleri konjugasyon ile diğer bakterilere taşınmazlar.
- Plazmitler gen aktarımı konusunda büyük önem arz etmektedir.
- İlerleyen bölümlerde plazmitlerle gen aktarımı ayrıntılı olarak ele alınacaktır.

Transformasyon

- Hücre dışından küçük bir DNA parçasının canlı bir bakteri tarafından alınmasıdır.
- Alıcı hücrede kalıcı genetik değişikliğe neden olur.
- Transformasyon, genetik materyalin DNA olduğunun gösterildiği deneylerde de rol oynayan işlemdir.

Transformasyon

- Transformasyon iki temel işlevin gerçekleşmesini sağlar:
 - Alıcı hücreye DNA'nın girişi
 - Alıcı kromozomdaki homolog bölge ile verici DNA'nın yer değiştirmesi
- Bazen DNA hücre içine girebilir ama homolog DNA ile yer değiştirmeyebilir.

Alıcı uyumlu hücreler

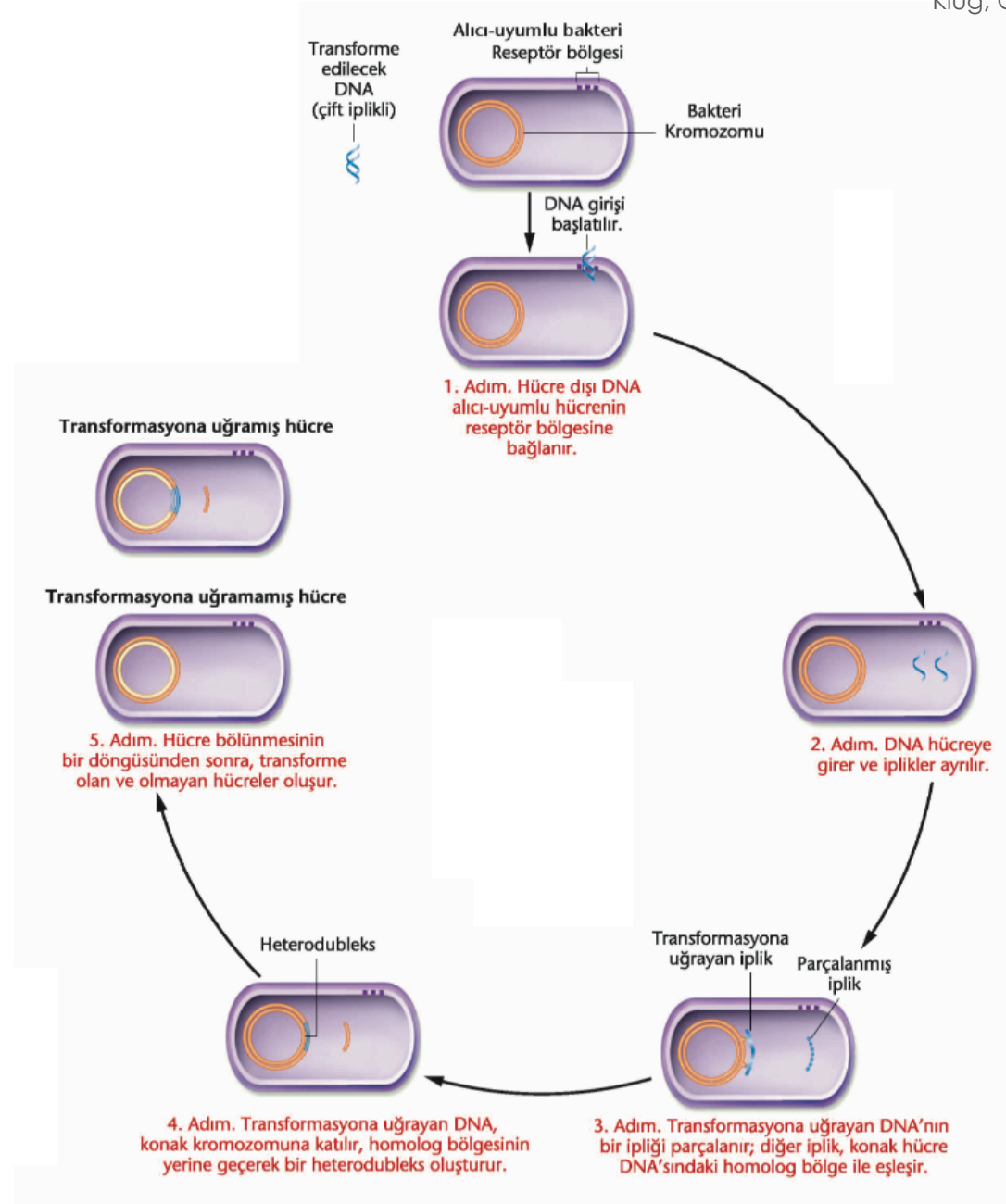
- Transformasyon yalnızca alıcı uyumlu (ehil, kompetan) hücreler tarafından gerçekleştirilmektedir.
- DNA'nın girişi, bakteri yüzeyindeki reseptör bölgelerinden olur.
- Hücreye giren DNA'nın iki ipliğinden biri nükleazlarla kesilir ve tek iplik kalır.

Alıcı uyumlu hücreler

- Kalan tek iplik, bakteri kromozomundaki homolog bölge ile karşı karşıya gelir.
- Enzimler aracılığıyla homolog bölgedeki DNA ile yer değiştirir.
- Çıkarılan kromozom parçalanır.

Heterodubleks DNA yapısı

- Transformasyon, yabancı DNA'nın bakteri kromozomuna entegre olması ile sonuçlanır.
- Bu durumda bakteri, aynı iplik üzerinde hem kendi orijinal kromozomunu hem de yabancı DNA'yı içerecektir.
- Bu yapıya heterodubleks yapı adı verilir.



Birlikte transformasyon (kotransformasyon)

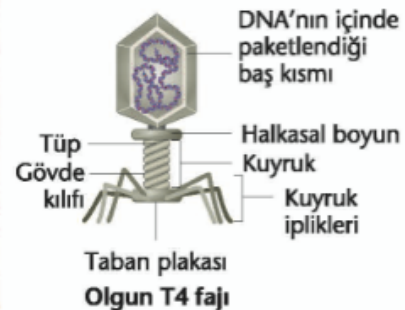
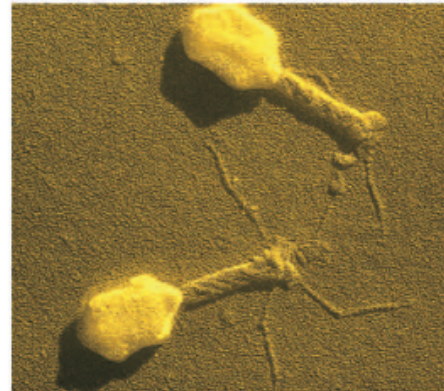
- Transformasyon yapılabilecek DNA uzunluğu *E. coli* kromozomunun yaklaşık 1/200'ü civarındadır.
- 10.000 ile 20.000 nükleotit çifti arasında değişir.
- Bu uzunluk pekçok geni kodlamak için yeterlidir.
- Birbirine bitişik ya da yakın olan genler birlikte transfer edilir.
- Bu olaya birlikte transformasyon (kotransformasyon) adı verilir.

Bakteriyofajlar

- Fajlar olarak da bilinirler.
- Konak organizmaları bakteriler olan virüslerdir.

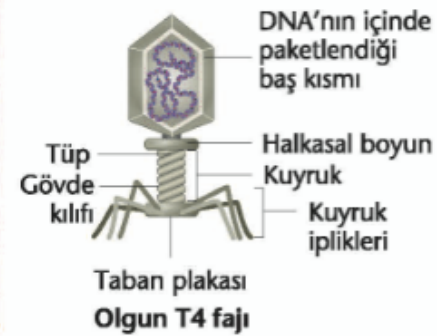
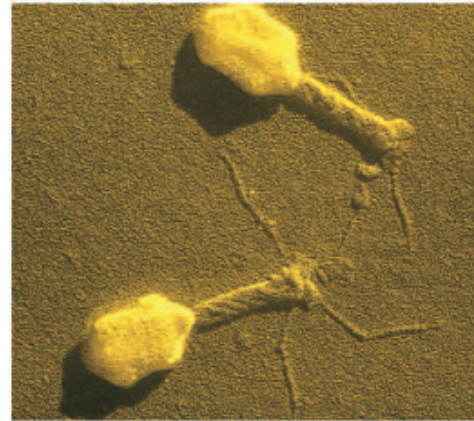
T4 faji

- T çift fajları denilen, birbirine yakın bakteri virüsleri grubunun bir üyesidir.
- İkozahedral (20 yüzü olan polihedron) protein kılıf ve içinde genetik materyali (DNA) ile birlikte virüsün baş kısmını oluşturur.



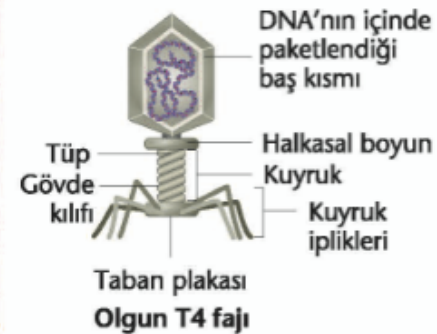
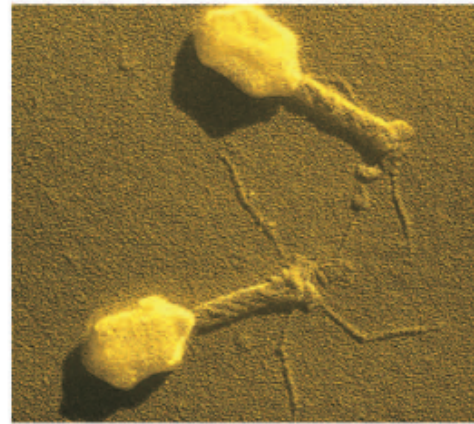
T4 faji

- DNA'sı 150'den fazla geni kodlayacak büyüklüktedir.
- Ayrıca bir de kuyruk kısmı bulunur.



T4 faji

- Kuyruktan çıkan kuyruk iplikleri ve bunların ucunda bağlanma bölgeleri bulunur.
- Bu bölgeler, *E. coli* hücre duvarı yüzeyindeki özgül bölgeleri tanır.



T4 fajının hayat döngüsü

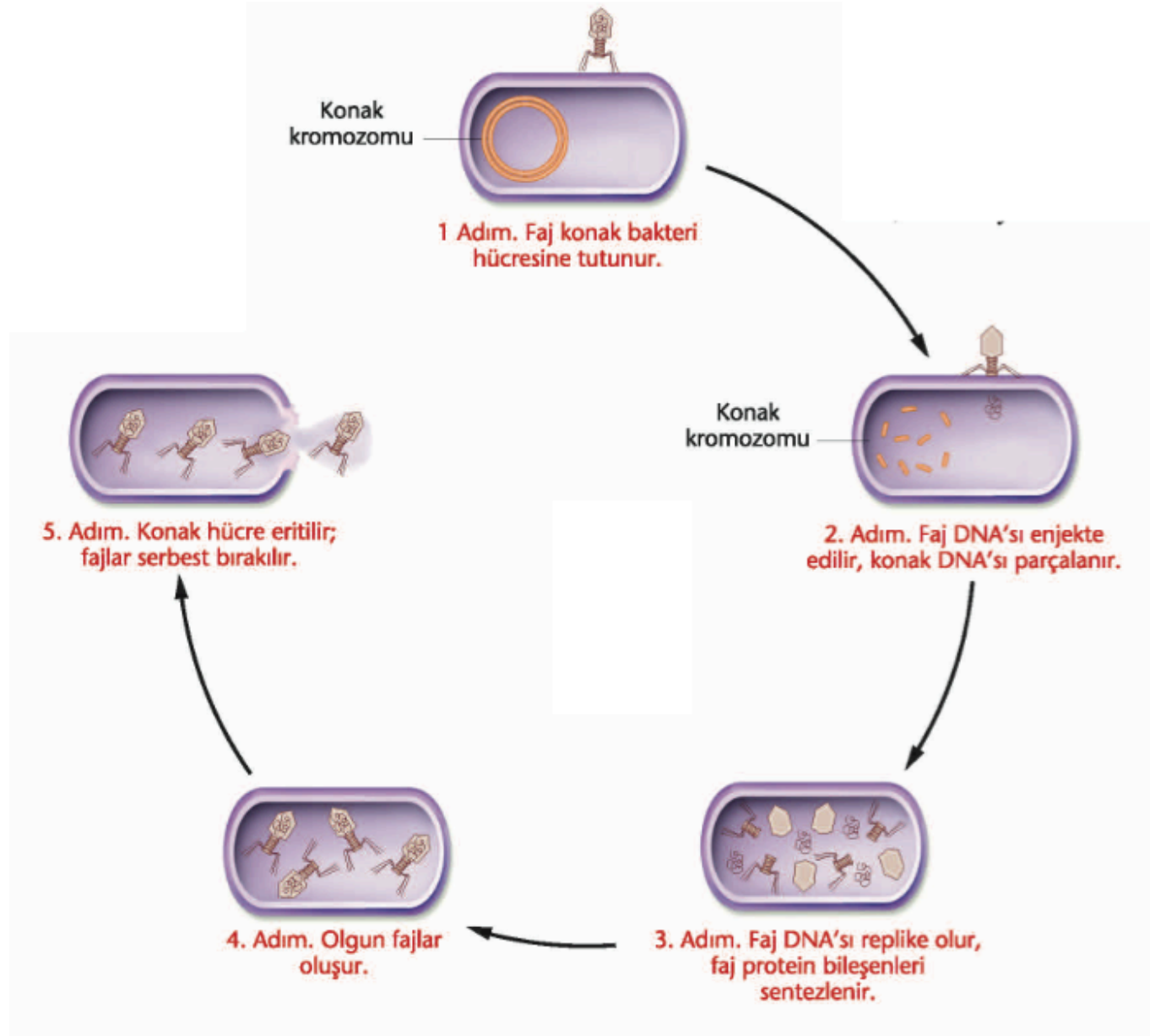
- Virüsün konak bakteri hücrelerine tutunmasıyla başlar.
- ATP enerjisi ile kuyruk kılıfları kasılır.
- DNA ileri itilir ve bakteriyel sitoplazmasına geçer.
- Dakikalar içinde bakteriyeye ait DNA, RNA ve protein sentezi baskılanır ve viral moleküllerin sentezi başlar.

T4 fajının hayat dongüsü

- Ayrıca konak DNA'sının parçalanması da gerçekteşir.
- Faj DNA replikasyonu sonucunda viral DNA molekülü havuzu oluşur.
- Daha sonra baş, kuyruk ve kuyruk iplikleri sentezlenir.

T4 fajının hayat dongüsü

- Son aşamada ise bütün parçalar biraraya getirilerek olgun virüsler oluşturulur.
- Yaklaşık 200 virüs oluştuktan sonra bakteri hücresi patlatılır ve virüsler serbest kalır.

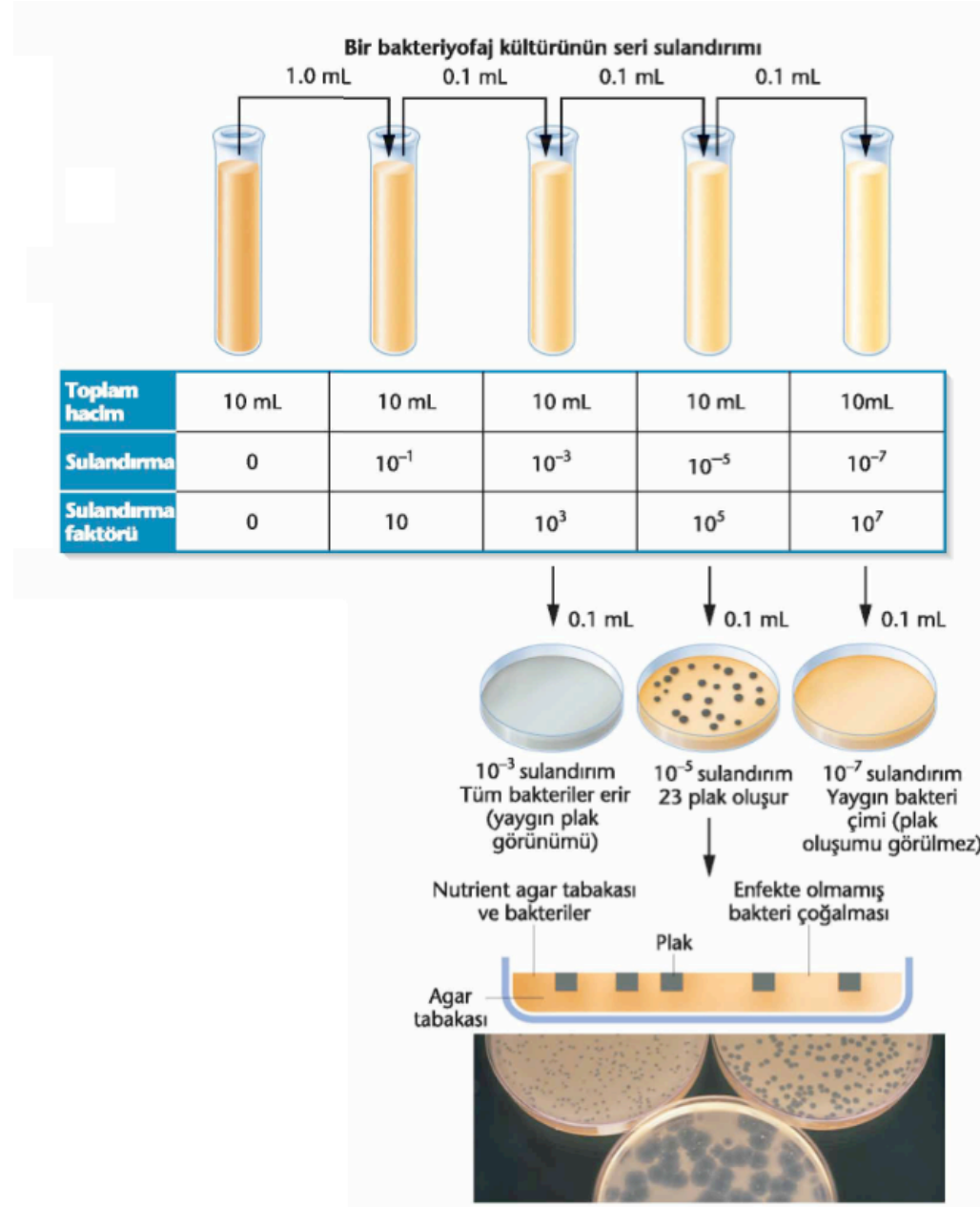


Plak deneyi (virüs yoğunluğunun hesaplanması)

- Virüs ile enfekte olmuş bakteri kültüründen, seri sulandırmalar yapılarak saf bakteriyofaj kültürü elde edilebilir.
- Daha sonra bu sulandırmalardan alınan örnekler ile (0.1 ml) sağlıklı bakteri kültüründen alınan örnekler karıştırılarak besiyerine ekilir.

Plak deneyi

- Inkübasyon sırasında bakteriler üreyerek hücre çimi adı verilen bir yapı şeklinde bütün petri plağını kaplar.
- Ancak faj ile enfekte yerlerde hücre çimi yerine plak adı verilen açık alanlar oluşur.
- Başlangıç kültüründen yapılan seri sulandırmaları takiben oluşan plaklar sayılarak başlangıç kültüründeki virüs yoğunluğu hesaplanabilir.



Lizojeni

- Virüs ile bakteri arasındaki ilişki her zaman lizis ile sonuçlanmaz.
- Bazen virüs, bakteri sitoplazmasına girdikten sonra, DNA'sı replike olmak yerine bakteri kromozomuna katılır.
- Bakteriyel kromozomun her replikasyonunda viral DNA da replike olur.

Lizojeni

- Yeni virüsler oluşmaz ve hücre lizise uğramaz.
- Ancak kimyasal maddeler, UV muamelesi gibi uyarılara cevap olarak viral DNA ayrılıp yeni virüsler oluşturmak üzere lizise yol açabilir.

Birkaç yeni tanım !!!

- Bakteriyel kromozoma katılmış viral DNA'ya profaj denir.
- Hem hücreyi lizise uğratan hem de profaj gibi davranan virüslere ılımlı (temperate) denir.
- Hücreyi yalnızca lizise uğratan fajlara virülant denir.

Birkaç yeni tanım !!!

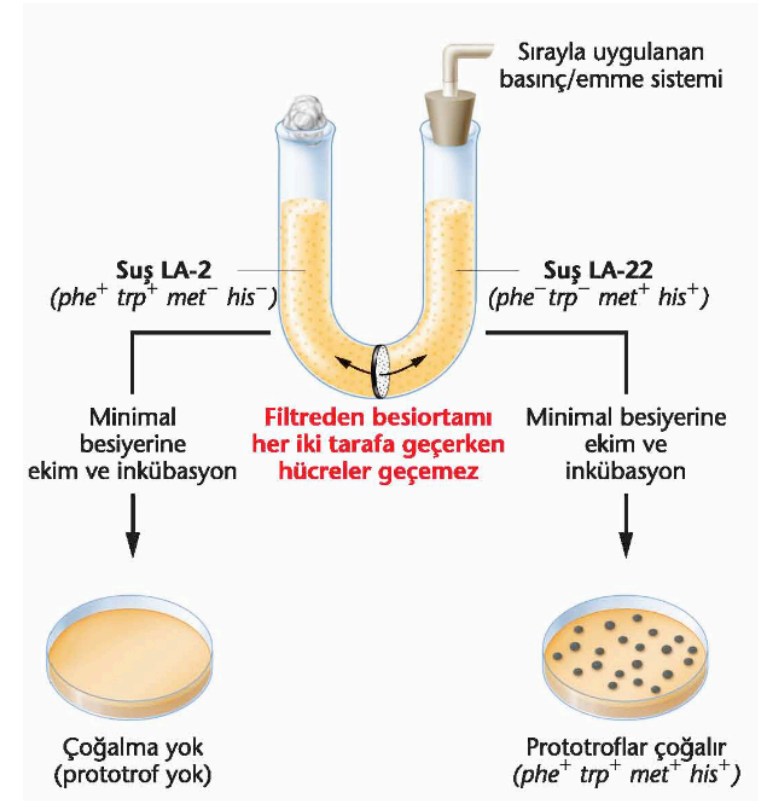
- Profaj içeren bakteri lizojenize olmuştur ve lizojenik olarak adlandırılır.
- Hem sitoplazmada kromozomdan bağımsız hem de kromozomun bir parçası olarak replike olabilen viral DNA'ya epizom adı verilir.

Transdüksiyon

- Bakteriyofajlar aracılığı ile yapılan bakteriyel rekombinasyon işlemidir.
- Bu olayı Lederberg-Zinder deneyi ile açıklamak mümkündür.

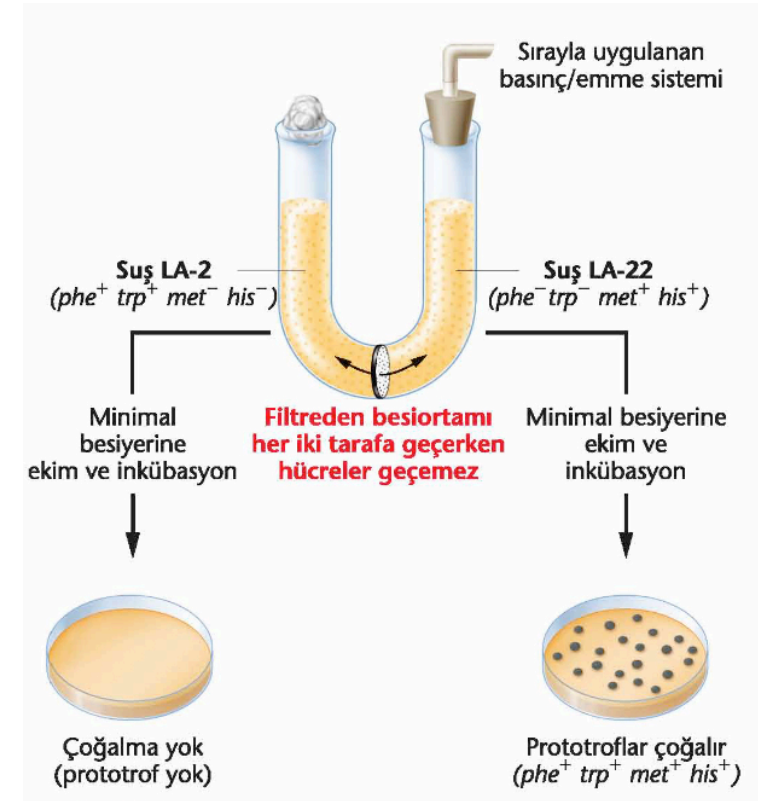
Lederberg-Zinder deneyi

- Bu araştırmacılar okzotrofik Salmonella suşları olan LA-22 ve LA-2'yi minimal besiyerinde karıştırarak prototrof hücreler elde etmişlerdir.
- LA-22, fenilalanin ve triptofan aminoasitlerini sentezleyememektedir ($phe^- trp^-$).
- LA-2 ise methionin ve histidin aminoasitlerini sentezleyemez ($met^- his^-$).



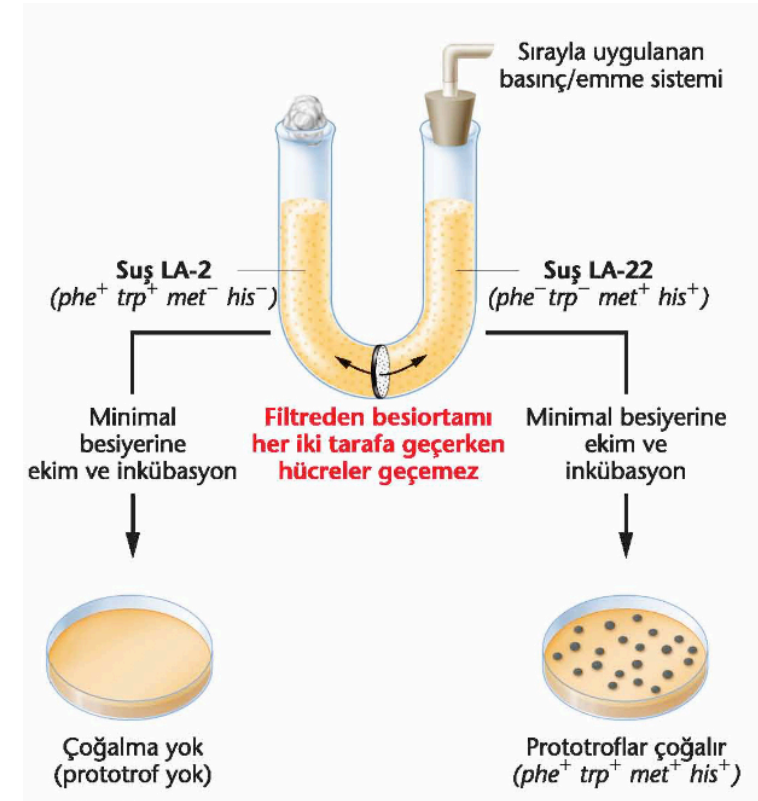
Lederberg-Zinder deneyi

- Prototroflar ise hepsini sentezleyebilmektedir ($phe^+ trp^+ met^+ his^+$).
- İlk bakışta bu rekombinasyonun kaynağı konjugasyon olarak düşünölmüştür.
- Daha sonra Davis U-tüpü kullanılarak konjugasyon olmadığı anlaşılmıştır.



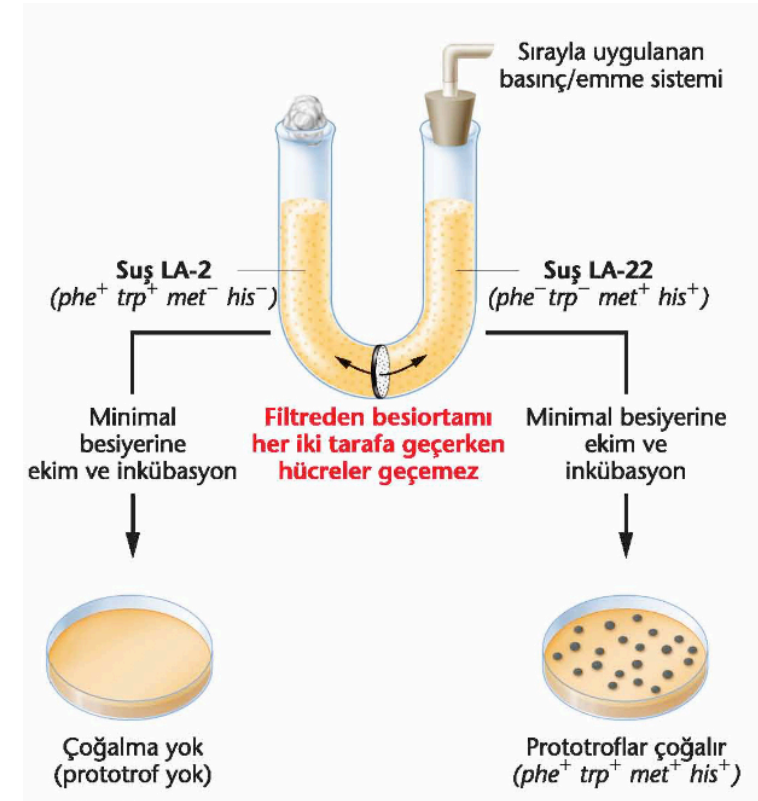
Lederberg-Zinder deneyi

- Davis U-tüpü, bakterilerin geçemediği, ancak besiyerinin her iki tarafa geçişine izin veren cam bir filtre içermektedir.
- Tüpün bir tarafına LA-22, diğer tarafına da LA-2 hücreleri yerleştirilmiştir.
- Her iki taraftan da örnekler alınarak minimal besiyerine ekildiğinde sadece LA-22 bakterilerinin olduğu tarafta prototrofların çoğaldığı görülmüştür.



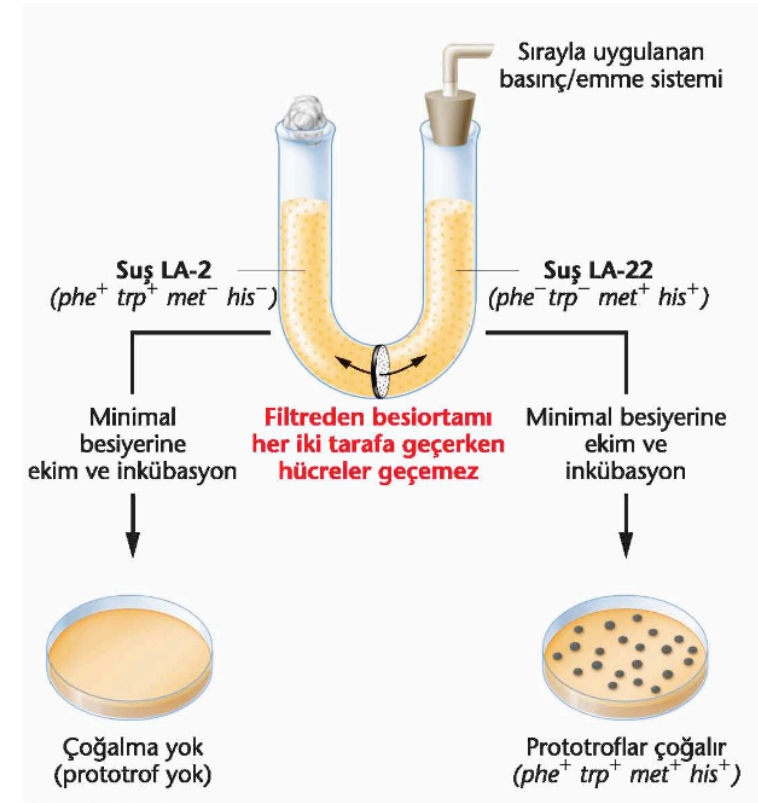
Lederberg-Zinder deneyi

- Eğer bundan konjugasyon sorumlu olsaydı, Davis U-tüpünün konjugasyonu tamamen engellemesi gerekirdi.
- Burada genetik rekombinasyonun kaynağı LA-2 hücreleridir (phe^+ ve trp^+).
- Fakat bilgi, LA-2 hücrelerinden filtreyi geçerek LA-22 hücrelerine nasıl aktarılmıştır?



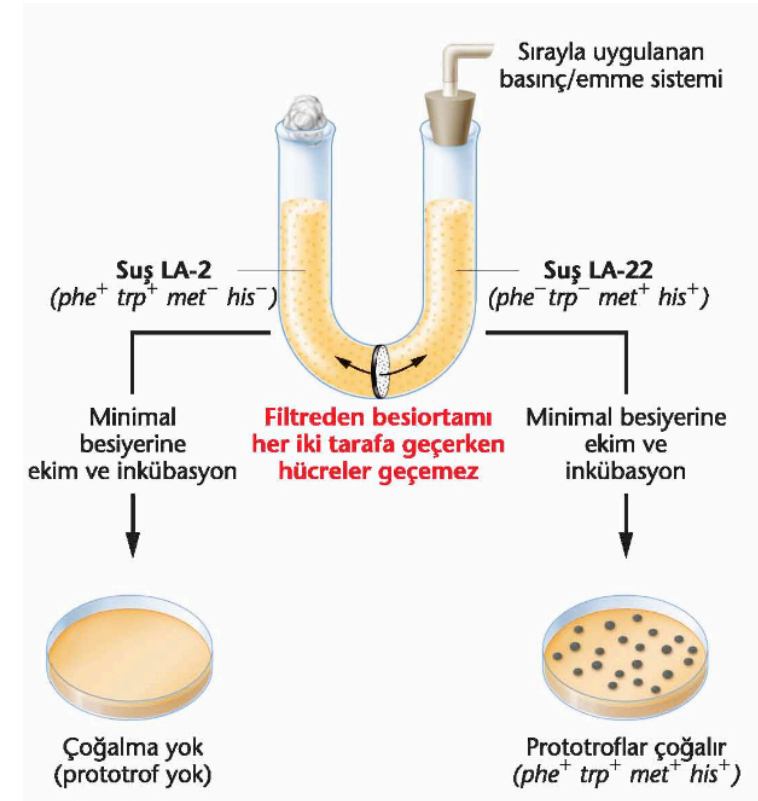
Lederberg-Zinder deneyi

- Bunu sağlayan faktöre filtre edilebilir ajan (FA) denilmiş ve bilgi aktarımından sorumlu olduğu düşünülmüştür.
- Araştırmacılar, genetik rekombinasyon olayının, Salmonella LA-22 hücrelerinin kromozomunda başlangıçta profaj konumunda bulunan bakteriyofaj P22 ile yapıldığını öğrenmişlerdir.



Lederberg-Zinder deneyi

- P22 profajı nadiren litik faza geçebilir, çoğalır ve LA-22 hücrelerinden salınır.
- Fajlar bakterilerden küçük oldukları için U-tüpün gözeneklerinden geçebilir.
- Profaj, bakteri hücrelerinin kromozomundan ayrılırken bazen bir miktar bakteri kromozomunu da beraberinde alır.
- Eğer bu bölgeler phe^+ ve trp^+ genlerini taşıyorsa bu bilgi, diğer bakteriye aktarılacaktır.



Transdüksiyon çeşitleri

- Özelleşmiş transdüksiyon
- Genelleştirilmiş transdüksiyon

Özelleşmiş transdüksiyon

- Bazen, küçük bir bakteri DNA parçası viral kromozom ile birlikte paketlenabilir.
- Buna özelleşmiş transdüksiyon denir.
- Bu tip transdüksiyonda faj, kendi DNA'sına ilave olarak, bakteri DNA'sına ait birkaç özel gen taşır.

Genelleştirilmiş transdüksiyon

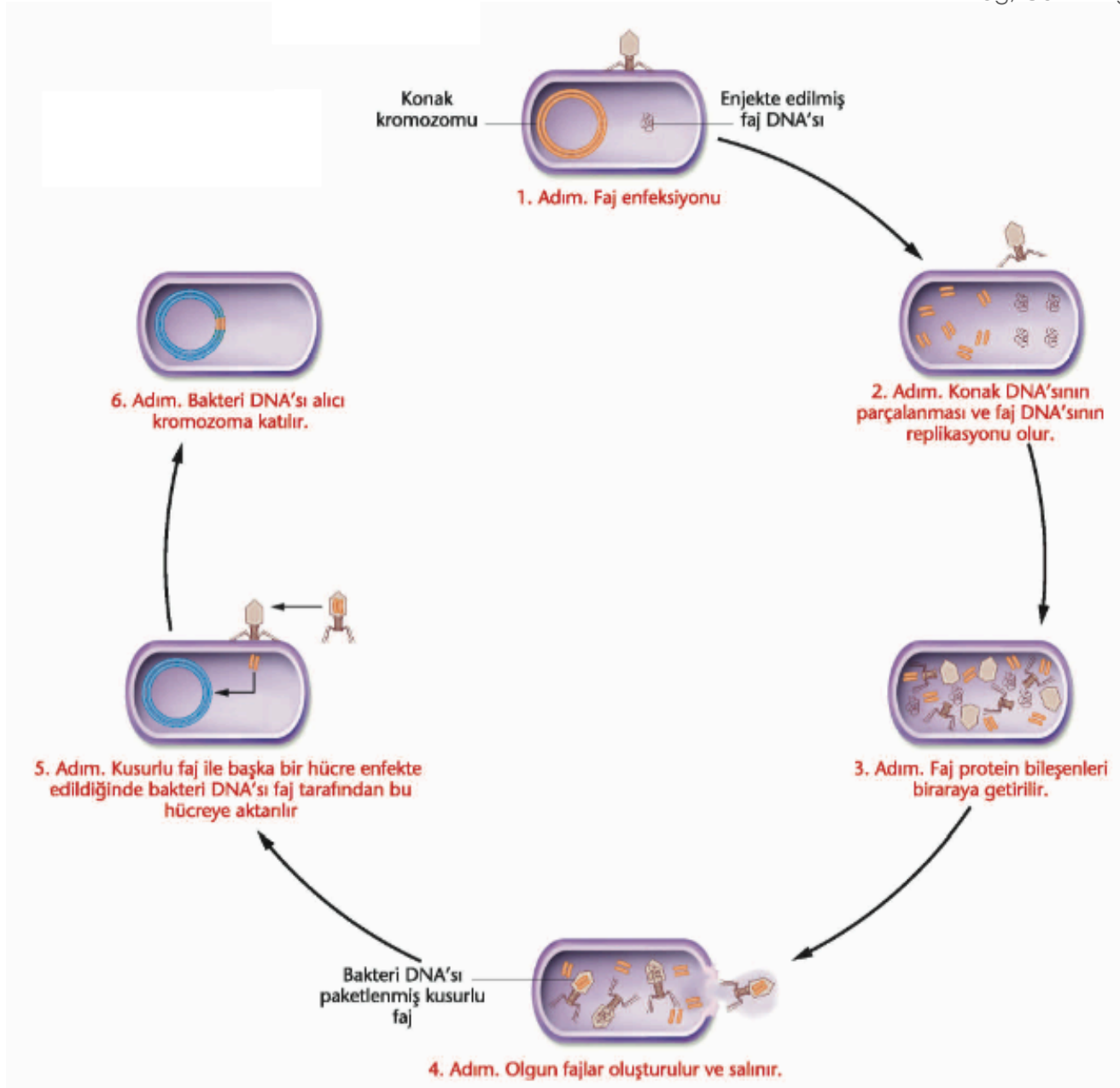
- Faj DNA'sı tamamen dışarıda kalır ve sadece bakteriyel DNA paketlenir.
- Virüs, paketlemiş olduğu bu bakteriyel DNA'yı başka bir hücreye enjekte ettiğinde bu DNA, ya sitoplazmada kalır ya da bakteri kromozomundaki homolog bölge ile birleşir.

Genelleştirilmiş transdüksiyon

- Sitoplazmada kalması durumunda replike olmaz.
- Ancak mitoz bölünme ile yavru hücrelerden birine geçer.
- Bu durumda hücrelerden sadece biri transdüksiyon ile geçen genler açısından kısmi diploit olur.

Genelleştirilmiş transdüksiyon

- Buna tamamlanmamış (başarısız, abortif) transdüksiyon denir.
- Eğer bakteriyel DNA, bakteri kromozomunun homolog bölgesi ile birleşirse mitoz bölünme ile tüm yavru hücrelere geçebilir.
- Bu işleme de tamamlanmış transdüksiyon denir.

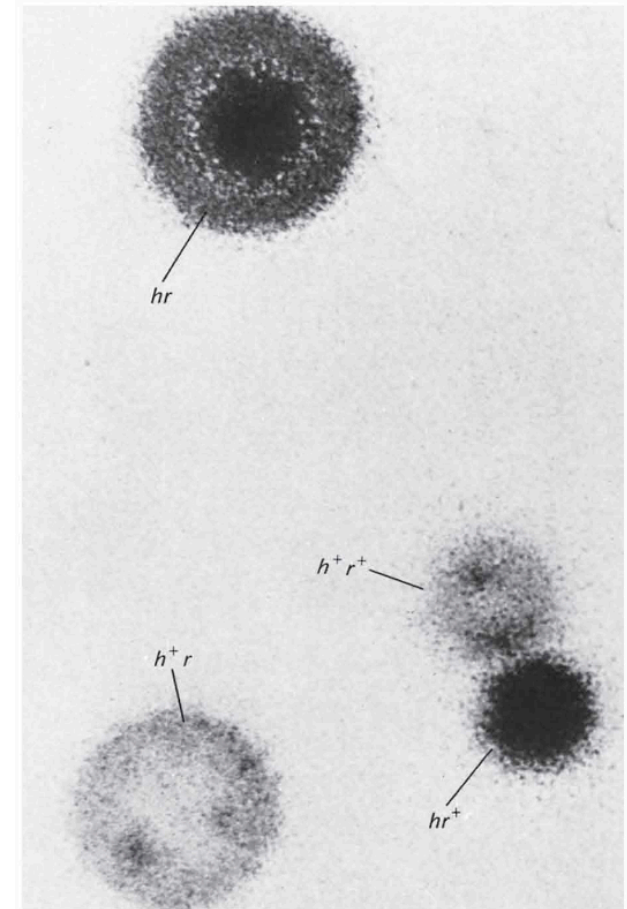


Birlikte transdüksiyon (kotransdüksiyon)

- Transdüksiyonda rol alan DNA fragmenti, çok sayıda geni içine alacak kadar büyüktür.
- Bakteri kromozomu üzerinde birbirine yeterince yakın olan iki gen, transdüksiyon ile birlikte taşınabilir.
- Buna, birlikte transdüksiyon (kotransdüksiyon) adı verilir.

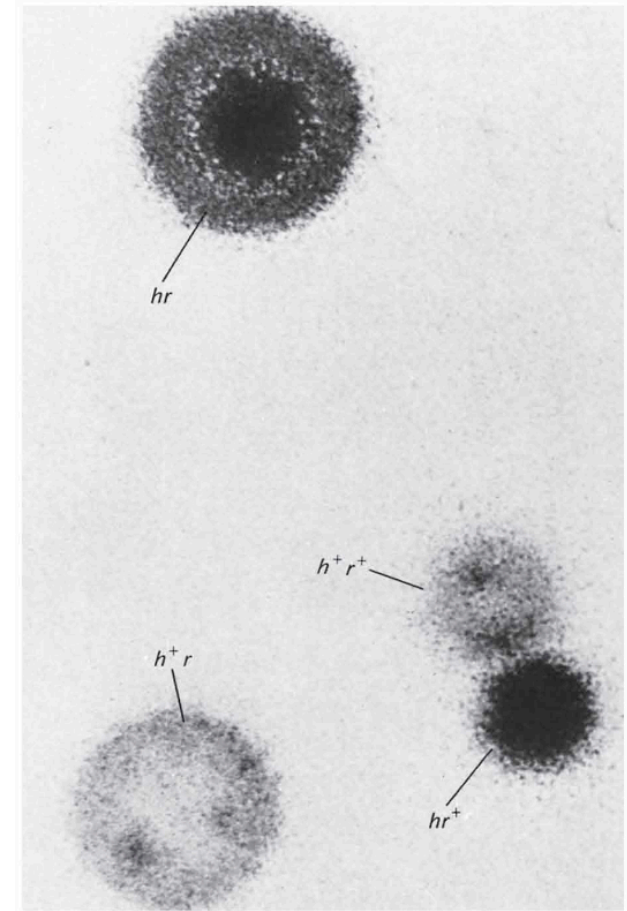
Fajlarda mutasyon (r mutasyonu)

- Faj mutasyonları genelde bakteri hücre lizisini takiben oluşan plağın morfolojisini etkiler.
- 1946 yılında Alfred Hershey, *E. coli* B suşunun üretildiği petri kabında alışılmadık bir T2 plağına rastlamıştır.
- Normal T2 plakları küçük, yaygın, açık bir hale ile çevrilmiş berrak bir merkeze sahiptir.



Fajlarda mutasyon (r mutasyonu)

- Alışılmadık plaklar ise daha büyük ve dış çevreleri daha belirgindir.
- Bu anormal plakların oluşumuna yol açan mutant fajlar hızlı lizis (r) olarak isimlendirilmiştir.
- Çünkü plaklar daha geniştir, daha hızlı ve daha verimli hayat döngüsüne sahip fajların ürediğini göstermektedir.



Fajlarda mutasyon (konak seçeneği-hos range; h)

- Bu mutasyon, fajın enfekte edebileceği konak bakteri çeşidini artırır.
- Yabancıl tip T2 fajı, E. coli B suşunu enfekte etmektedir.
- Fakat h mutasyonu geçirmiş T2 fajları, E. coli B-2 hücrelerini de enfekte edebilmektedir.

Karışık enfeksiyon deneyleri

- Bu deneylerde iki farklı mutant fajın, aynı bakteri hücrelerini aynı anda enfekte etmesi sağlanmıştır.
- Her bir mutant faj, farklı genler içerdiği için bu olaya genler arası rekombinasyon adı verilir.

Karışık enfeksiyon deneyleri

- Örneğin; T2/*E. coli* sistemi kullanılarak yapılan bir çalışmada atasal tip virüs:
 - Ya h^+ (yabanıl tip konak seçeneği / hızlı lizis)
 - Ya da hr^+ (daha fazla konak seçeneği / normal lizis) genotipine sahip olsun.

Karışık enfeksiyon deneyleri

- Eğer hiç rekombinasyon olmazsa, yavru fajların bu iki atasal genotipe sahip olması beklenir.
- Ancak atasal genotiplere ilave olarak h⁺r⁺ ve hr genotipli fajlara da rastlanmıştır.
- Bu örnekteki rekombinasyon sıklığı aşağıdaki formül ile hesaplanabilir:

$$(h^{+}r^{+}) + (hr) / \text{toplam plak} \times 100$$

Peki rekombinant fajlar nasıl oluştu?

- Faj enfeksiyonunun erken safhalarını takiben faj kromozomu replikasyona başlar.
- İlerleyen aşamada bakteri sitoplazmasında faj kromozom havuzu oluşur.
- Eğer iki farklı faj tarafından enfeksiyon gerçekleşmiş ise, kromozom havuzunda her iki kromozom tipi de bulunacaktır.

Peki rekombinant fajlar nasıl oluştu?

- Havuz içinde bulunan kromozom parçaları arasında crossing-over'a benzer şekilde parça değişimi gerçekteşir.
- Genler arasında parça değişimi olabileceği gibi, bir tek gen içindeki çeşitli noktalarda da parça değişimi gerçekteşebilir.

T4 fajında *rll* lokusu

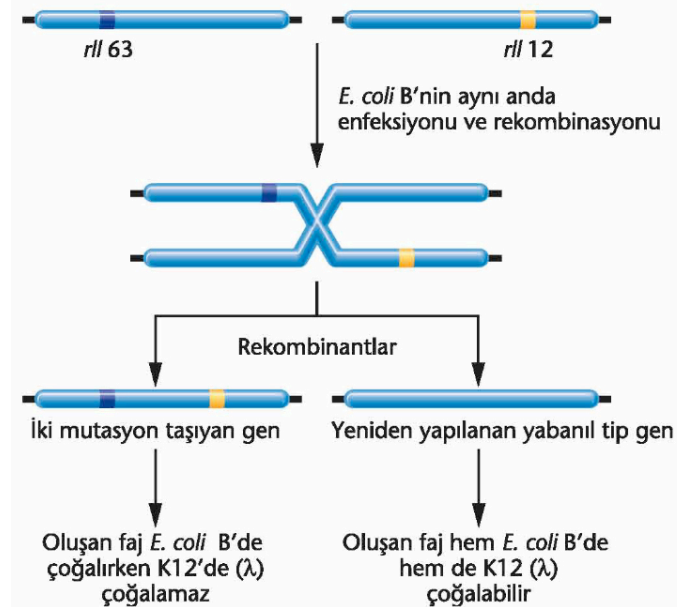
- Genetik analizlerde, incelenen genin çok sayıda mutantını izole etmek son derece önemlidir.
- *rll* gen lokusu açısından mutant olan bir faj, *E. coli* B suşunda farklı bir plak görünümüne yol açar.
- *rll* ile yapılan çalışmalarda yaklaşık 20.000 farklı mutant elde edilmiştir.

T4 fajında *rII* lokusu

- Seymour Benzer tarafından yapılan çalışmada elde edilen mutant fajlar, *E. coli* B suşunu kolayca enfekte edebilirken, *E. coli* K12 suşunu lizise uğratamayan *rII* mutantlarıdır.
- Ancak yabani tip fajlar hem B hem de K12'yi lizise uğratabilmektedir.

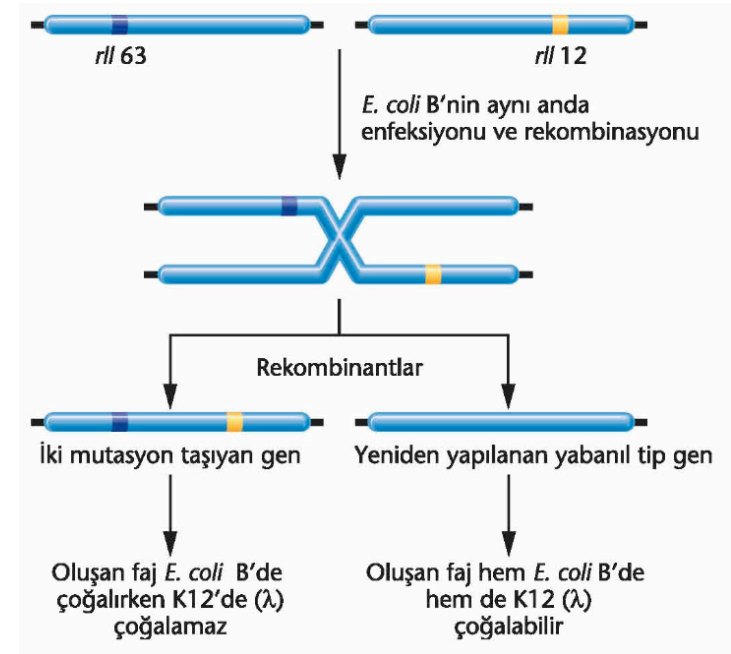
T4 fajında *rII* lokusu

- İki mutant bölge arasında meydana gelen parça değişimi sonucunda oldukça nadir de olsa yabancı tip rekombinantlar oluşabilir.



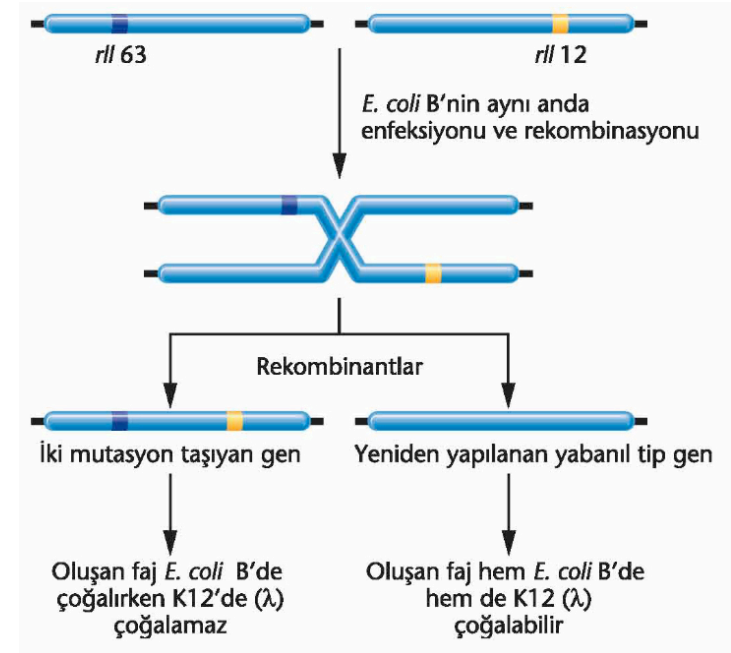
T4 fajında *rII* lokusu

- Eğer iki farklı mutant suştan oluşan fajların *E. coli* B suşunu aynı anda enfekte etmesi sağlanırsa,
- iki mutant bölge arasında meydana gelen parça değişimi sonucunda oldukça nadir de olsa yabancı tip rekombinantlar oluşacaktır.



T4 fajında *rll* lokusu

- Eğer % 99.9 *rll* fajı ve % 0.1'den az yabancı faj içeren faj popülasyonunun K12'yi enfekte etmesi sağlanırsa,
- Yabancı tip rekombinantlar tekrar ortaya çıkar ve yabancı tip plakları başarılı bir şekilde oluşturur.

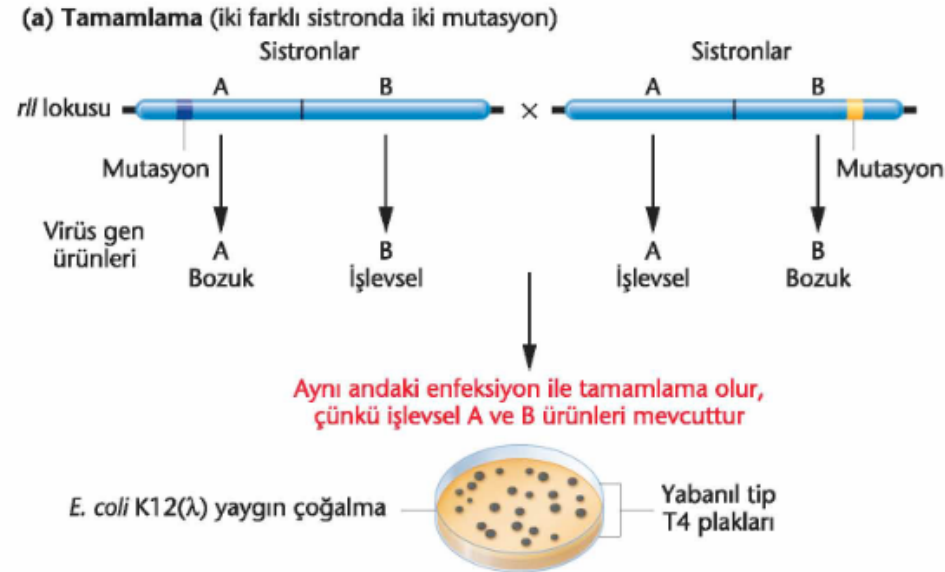


rll mutasyonu ile tamamlama deneyleri

- Seymour Benzer, *E. coli* K12 suşunu, iki farklı *rll* mutant suş çifti ile aynı zamanda enfekte etmiştir.
- Bu iki *rll* mutant suş çifti, bakteriyi lizise uğratamayan mutasyonlara sahip suşlardır.
- Ancak deneyler sırasında bazı mutant *rll* suşlarının bakteriyi lizise uğrattığını gözlemlemiştir.

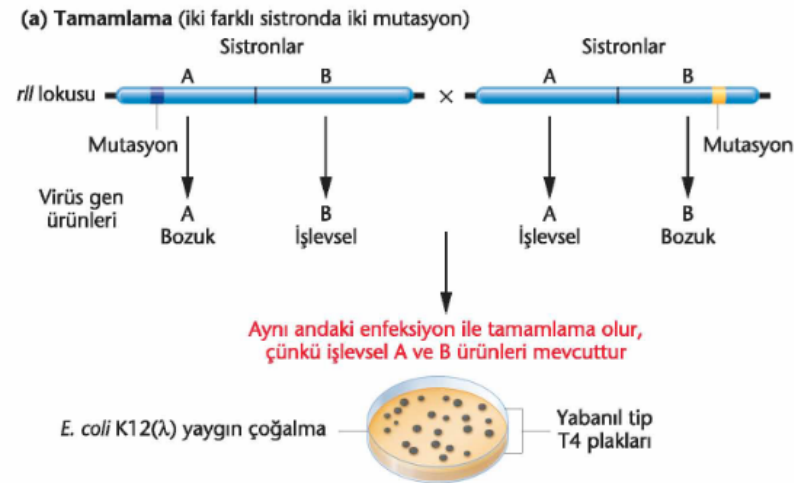
rll mutasyonu ile tamamlama deneyleri

- Peki lizise uğratma yeteneği olmayan iki farklı mutant *rll* suşu, nasıl oluyor da lizojenik yetenek kazanıyor?

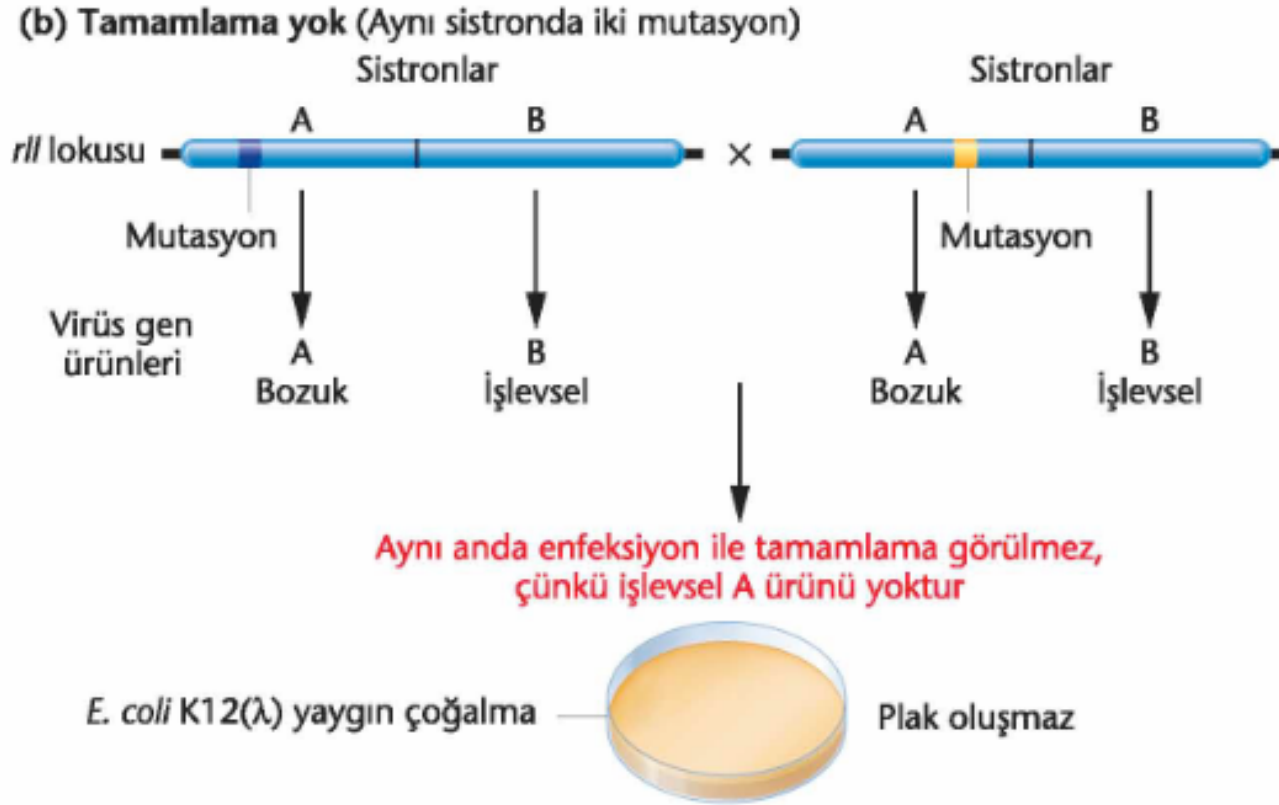


rll mutasyonu ile tamamlama deneyleri

- Araştırmacı, aynı anda olan bu enfeksiyon sırasında her bir mutant suşun, diğerinde olmayan bir şeyi temin ederek yabanıl işlev kazandığı sonucuna varmıştır.
- Bu olay, tamamlama (komplementasyon) olarak bilinir.



Tamamlama olmaz ise;



rll gen haritası

- Seymour Benzer, birkaç yıllık çalışmadan sonra (rekombinasyon analizleri, *rll* lokusu parça çıkarma testleri vb), t4 fajının *rll* lokusunu içine alan iki sistronun genetik haritasını çıkarmıştır.
- 20.000 mutasyonun analizi sonucu, lokustaki 307 farklı bölgeyi birbirlerinin yerleşimine göre haritalandırmıştır.

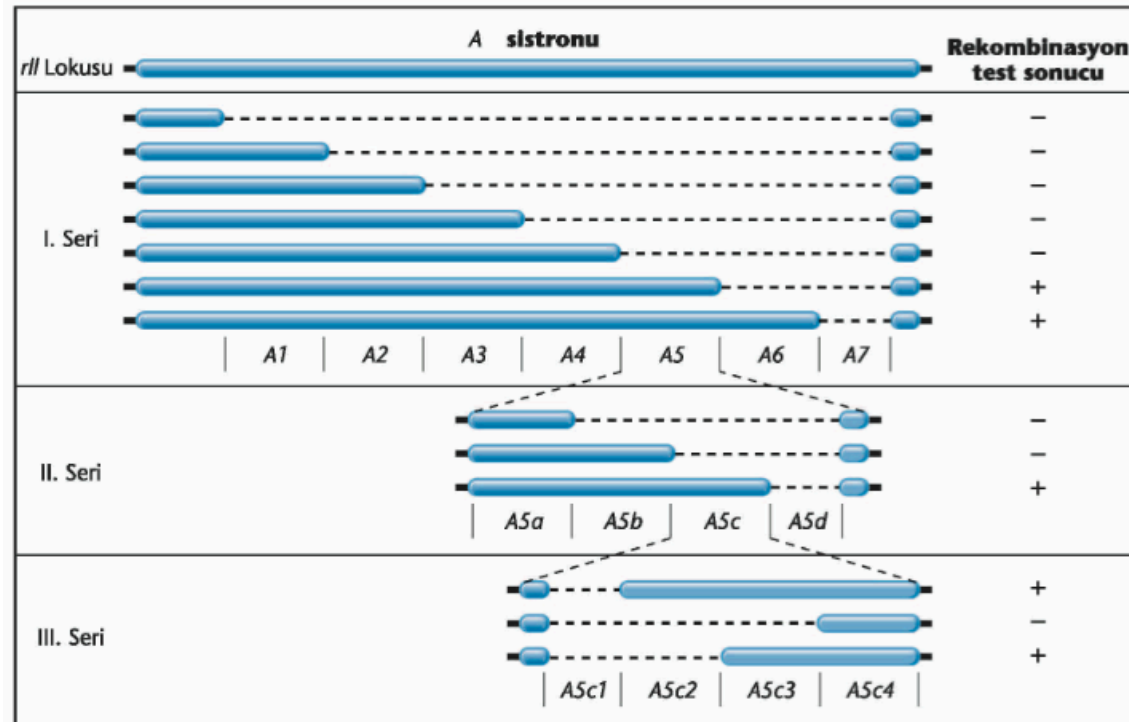
rll gen haritası

- Birçok mutasyonun görüldüğü alanlara sıcak noktalar (hot spots) adını vermiştir.
- Bu bölgelerde mutasyon olma olasılığı, birkaç mutasyon görülen alanlardan daha fazladır.
- Ayrıca hiçbir mutasyonun olmadığı alanlar da mevcuttur.

rll gen haritası

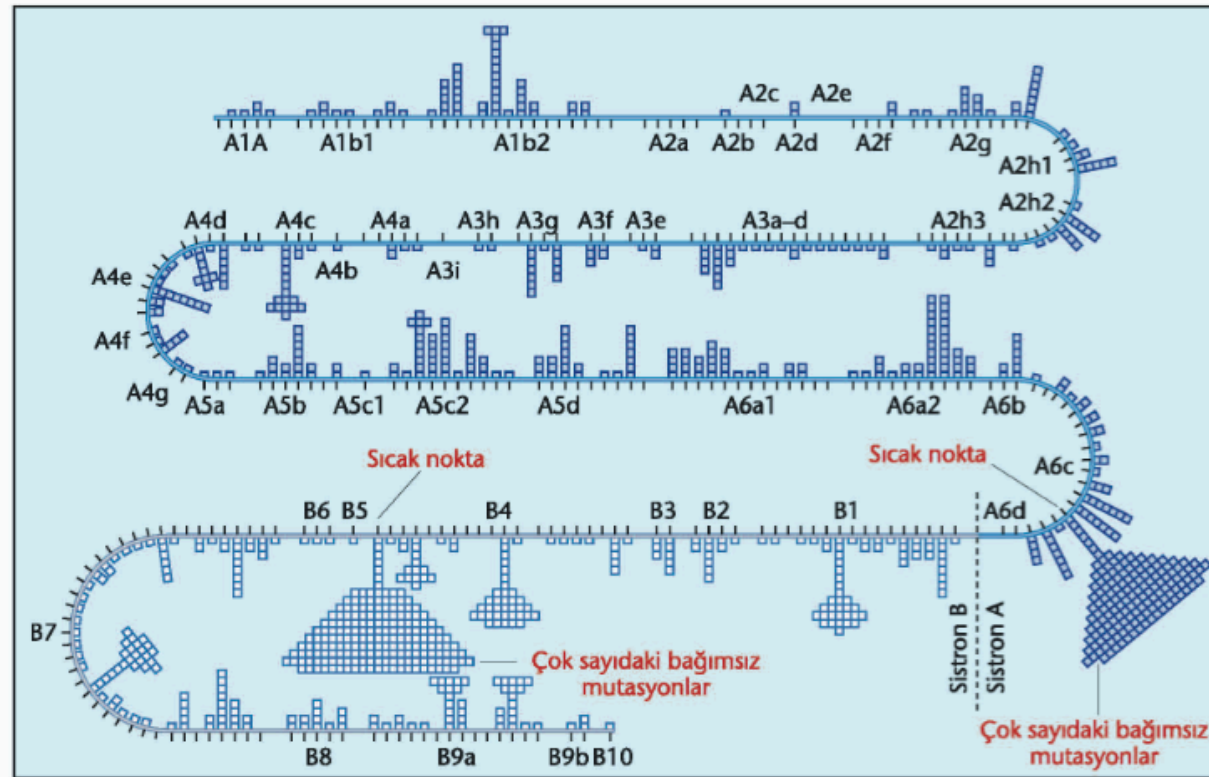
- Çalışmalar sırasında 200 kadar rekombinasyon biriminin yerinin belirlenemediği tahmin edilmektedir.
- Araştırmacı, 1955 yılında genlerin bölünmez bir birim olduğunu,
- Fakat özgül bir şekilde sırası olan, mutasyonel ve rekombinasyonel birimler olduğunu göstermiştir.
- Biz bunların bugün, DNA'yi oluşturan nükleotit dizileri olduğunu biliyoruz.

rll gen haritası



ŞEKİL 6-24 Bilinmeyen *r* mutasyonunun pozisyonunu belirlemek için kullanılan *rll* genetik bölgesinin A sistronundaki örtüşen üç delesyon serisi. Örneğin, eğer yabancıl tip projeni rekombinantlarının üretimi için I. serideki her delesyon (kesikli çizgi) bir mutant suşa karşı denenmiş ve sağda gösterildiği gibi sonuçlar (+ veya -) alınmışsa, mutasyon A5 parçasında olmalıdır. II. seride mutasyonun yeri daha daraltılarak A5c parçasına ve 3. seri de A5c3 parçasına indirilmiştir.

rll gen haritası



ŞEKİL 6-25 T4 fajının *rll* lokusunda A ve B sistronlarındaki mutasyonlarının kısmi haritası. Her kare bağımsız olarak izole edilen mutasyonu gösterir. "Sıcak noktalar" olarak isimlendirilen, mutasyon sayısının en fazla olduğu iki alana (A6cd ve B5) dikkat ediniz.